

Université de Sherbrooke

EFFETS DE L'ACTH ET DE L'ANGIOTENSINE II SUR LE CALCIUM  
INTRACELLULAIRE DANS DES CELLULES GLOMERULEES DE  
SURRENALES DE RAT ET DE BOEUF EN CULTURE

Par

Eric Tremblay

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de  
médecine en vue de l'obtention du  
grade de maître ès-sciences (M.Sc.)

Avril 1992



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Canadian Theses Service    Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada  
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

ISBN 0-315-76180-6

Canada



Ce mémoire est dédié à mes enfants

Raphaël et Laressa...

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	iii
Abréviations.....	x
Liste des illustrations.....	xii
Résumé.....	xv

## I- INTRODUCTION

1.	Description de la structure du cortex	
	surrénalien.....	1
1.1	Rappel sur la morphologie.....	1
1.2	Ultrastructure de la zone glomérulée..	1
2.	Fonction de la zone glomérulée.....	5
2.1	Synthèse des minéralocorticoïdes.....	5
2.2	Mécanisme intracellulaire de la	
	synthèse de l'aldostérone.....	6
2.3	Mécanisme de sécrétion des	
	minéralocorticoïdes.....	9
2.4	Effets physiologiques de	
	l'aldostérone.....	10
3.	Régulation de la sécrétion d'aldostérone.....	10
3.1	Rôles des ions.....	11
3.1.1	Potassium.....	11
3.1.2	Sodium.....	12

3.1.3	Calcium.....	14
3.2	Rôle du système rénine- angiotensine.....	15
3.3	Rôle de l'hormone adrénocorticotro- phique.....	16
3.4	Autres facteurs.....	16
4.	Couplage excitation-sécrétion.....	18
4.1	Introduction.....	18
4.2	Rôle du calcium dans le mécanisme d'action des hormones.....	18
4.2.1	Cas de l'ACTH.....	18
4.2.2	Cas de l'angiotensine II.....	22
4.2.3	Cas de l'ion potassium.....	26
4.3	Mesures de la concentration de calcium intracellulaire.....	27
4.3.1	Utilisation du Fura-2 sur différents types cellulaires.....	29
4.3.1.1	Mesures de $[Ca^{2+}]_i$ sur des populations de cellules.....	29
4.3.1.2	Mesure de $[Ca^{2+}]_i$ sur cellule unique.....	29
4.3.1.2.1	Microspectrofluorométrie.....	29
4.3.1.2.2	Mesure de $[Ca^{2+}]_i$ par la technique d'imagerie.....	31
5.	But du travail.....	32

II-	MATERIEL ET METHODES.....	34
1.	Modèle biologique.....	34
1.1	Animaux.....	34
1.2	Cultures cellulaires.....	34
1.2.1	Préparation des cellules.....	34
1.2.1.2	Sacrifice des animaux et prélèvement des glandes.....	34
1.2.1.3	Dissection des zones du cortex surrénalien.....	35
1.2.1.3	Isolement des cellules de la zone glomérulée.....	36
1.2.2	Culture cellulaire (Pétri).....	38
1.2.3	Culture cellulaire sur lamelle de verre.....	39
2.	Substances et solutions utilisées.....	39
2.1	Substances et hormones utilisées.....	39
2.2	Solutions.....	40
2.2.1	Milieux de culture.....	40
2.2.2	Solutions utilisées lors des mesures du calcium intracellulaire.....	41
2.2.2.1	Milieu de charge.....	41
2.2.2.2	Milieu d'hydrolyse.....	41
2.2.2.3	Milieux de perfusion.....	41
2.2.3	Solutions utilisées lors des dosages radioimmunologiques.....	42

2.2.4	Solutions utilisées lors des mesures d'AMP cyclique.....	42
2.2.4.1	Milieu d'incubation avec l'adénine tritiée.....	42
2.2.4.2	Milieu de stimulation.....	43
3.	Mesures de l'activité biologique.....	43
3.1	Stimulation hormonale sur les cultures cellulaires.....	43
3.2	Dosage de la corticostérone.....	44
3.3	Dosage de l'aldostérone.....	45
4.	Mesures d'AMPC intracellulaire.....	46
5.	Mesures de calcium intracellulaire par fluorescence.....	47
5.1	L'indicateur fluorescent Fura-2.....	47
5.2	Chargement des cellules avec le Fura-2 AM.....	49
5.3	Mesures de calcium intracellulaire par microspectrofluorométrie.....	49
5.4	Mesures du calcium intracellulaire avec la technique d'imagerie.....	51
5.5	Calibration de la fluorescence.....	52
III-	RESULTATS.....	54
1.	Niveaux de base de la concentration du calcium intracellulaire.....	54

2.	Mesures du calcium intracellulaire par microspectrofluorométrie.....	57
2.1	Effets de différentes hormones et ions sur la $[Ca^{2+}]_i$ sur des cellules glomérulées en culture.....	57
2.1.1	Effet de l'angiotensine II.....	57
2.1.2	Effet du potassium.....	60
2.1.3	Effet de l'ACTH.....	60
2.2	Effet d'un milieu sans calcium sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ACTH, l'angiotensine II sur des cellules glomérulées en culture.....	65
2.2.1	Stimulation par l'angiotensine II.....	65
2.2.2	Stimulation par l'ACTH.....	66
2.3	Effets de différentes dihydropyridines sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'angiotensine II et l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.....	71
2.3.1	Effet de la nifédipine.....	71
2.3.2	Effet du BayK 8644.....	74
2.4	Effets de différentes substances qui augmentent l'AMPC intracellulaire sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induit par l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.....	77



2.4.1	Effet du 8-bromo-AMPC.....	77
2.4.2	Effet du fluorure d'aluminium.....	78
2.5	Effet d'un inhibiteur de la PKA sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.	78
3.	Mesures de calcium intracellulaire par la technique d'imagerie.....	83
3.1	Changements de la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'angiotensine II.....	86
3.2	Changements de la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'ACTH.....	89
4.	Mesures de sécrétions hormonales.....	94
4.1	Effet de l'ACTH <sub>1-24</sub> et des fragments, ACTH <sub>1-10</sub> et ACTH <sub>11-24</sub> sur la sécrétion de la corticostérone et d'aldostérone par des cellules glomérulées en culture...	94
4.2	Effet d'un milieu sans calcium sur la sécrétion de stéroïdes induite par l'ACTH <sub>1-24</sub> , l'ACTH <sub>1-10</sub> et l'ACTH <sub>11-24</sub> par des cellules glomérulées en culture.....	97
5.	Mesures d'AMPC intracellulaire.....	100
5.1	Effet de l'ACTH <sub>1-24</sub> , ACTH <sub>1-10</sub> , ACTH <sub>11-24</sub> sur la production d'AMPC dans des cellules glomérulées en culture.....	100

IV- DISCUSSION.....	103
1. Niveau basal de calcium intracellulaire.....	103
2. Régulation du calcium intracellulaire par les stimuli.....	104
2.1 Angiotensine II.....	104
2.2 ACTH.....	106
3. Relation structure-activité de l'ACTH.....	112
V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	115

#### REMERCIEMENTS

#### BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE	1. Milieux de culture
	2. Chambre de perfusion
	3. Schéma du microspectrofluorimètre
	4. Schéma du système d'analyse d'image

ABBREVIATIONSI- Unités

°C	degré celsius
$[Ca^{2+}]_i$	concentration intracellulaire de calcium
cm	centimètre
cpm	compte par minute
Fig.	figure
g	gramme
Hz	hertz
kg	kilogramme
M	concentration molaire
mg	milligramme
min.	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
mOs	milliosmole
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
pH	activité des ions hydrogène
pM	picomolaire
rpm	révolution par minute
U	unité
$\mu$ Ci	microcurie
$\mu$ g	microgramme

$\mu$ l	microlitre
$\mu$ m	micromètre
$\mu$ M	micromolaire
W	watt

## II- Molécules

ACTH	hormone adrénocorticotrophe
$AlF_4^-$	fluorure d'aluminium
AMPC	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AT	angiotensine II
ATP	adénosine 5'-triphosphate
BSA	albumine sérique bovine
DG	diacylglycérol
EGTA	éthylène bis(oxyéthylènenitrilo)tétraacétate
HBS	milieu de Hank
HEPES	4-(2-hydroéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonate
GMPc	guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
IBMX	isobutylméthylxanthine
$IP_3$	inositol 1,4,5-triphosphate
MSH	hormone mélanostimulante
NIFE	nifédipine
PKA	protéine kinase adénosine monophosphate cyclique dépendante
PLC	phospholipase C

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1: Section entière d'une glande surrénale  
de rat femelle.....3
- Figure 2: Schéma simplifié illustrant les étapes  
de la biosynthèse de l'aldostérone.....8
- Figure 3: Schéma illustrant tous les effecteurs impliqués  
dans la régulation de la biosynthèse de  
l'aldostérone lors d'une stimulation par  
l'angiotensine II.....25
- Figure 4: Oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  dans une  
cellule glomérulée de boeuf.....56
- Figure 5: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par  
l'angiotensine II dans des cellules glomérulées  
de surrénale de rat.....59
- Figure 6: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induit par le  
potassium.....62
- Figure 7: Effet de l'ACTH sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des  
cellules glomérulées de surrénale de rat.....64

Figure 8: Rôle du calcium extracellulaire dans les  
changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induits par  
l'angiotensine II dans des cellules glomérulées  
de surrénale de boeuf.....68

Figure 9: Rôle du calcium extracellulaire dans les  
changements induits par l'ACTH dans des  
cellules glomérulées de surrénale de boeuf.....70

Figure 10: Effet de la nifédipine sur la réponse de  
 $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'angiotensine II dans  
une cellule glomérulée de surrénale de boeuf....73

Figure 11: Effet du BayK 8644 sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des  
cellules glomérulées de surrénale de  
boeuf.....76

Figure 12: Effet du 8-bromo-AMPC sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des  
cellules glomérulées de boeuf.....80

Figure 13: Effet du fluorure d'aluminium sur la  $[Ca^{2+}]_i$   
dans des cellules glomérulées de boeuf.....82

Figure 14: Effet du HA1004 sur l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$   
induite par l'ACTH dans une cellule glomérulée  
de boeuf.....85



- Figure 15: Changements de la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par  
l'angiotensine II détectés par la technique  
d'imagerie.....88
- Figure 16: Changements de la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à l'ACTH  
détectés par la technique d'imagerie.....91
- Figure 17: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'ACTH  
détectés par l'imagerie.....93
- Figure 18: Courbes action-dose de la sécrétion de  
corticostérone et de l'aldostérone induites par  
l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub>, l'ACTH<sub>11-24</sub> et sur des  
cellules glomérulées de surrénale de rat.....96
- Figure 19: Courbes action-dose de la sécrétion de  
corticostérone et de l'aldostérone induites  
par l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub> et de l'ACTH<sub>11-24</sub>  
dans un milieu avec et sans calcium sur des  
cellules glomérulées de surrénale de rat.....99
- Figure 20: Courbe action-dose de la production d'AMPC  
induit par l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub>  
sur des cellules glomérulées de rat.....102

Effets de l'ACTH et de l'angiotensine II sur le calcium intracellulaire dans des cellules glomérulées de surrénales de rat et de boeuf en culture.

L'objectif initial de ce travail fut d'étudier et de comparer les changements dans les concentrations intracellulaires de calcium dans des cellules glomérulées de rat et de boeuf en culture, lors d'une stimulation avec soit l'angiotensine II, soit le potassium ou l'ACTH.

Dans cette étude, nous avons effectué nos mesures de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) à l'aide d'un marqueur fluorescent et spécifique au calcium, le Fura-2. L'utilisation de cet indicateur, combiné avec la microspectrofluorométrie et la technique d'imagerie, nous a permis d'analyser les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  sur des cellules individuelles ou groupe de cellules.

Les mesures effectuées avec la microspectrofluorométrie ont montré que le potassium, l'angiotensine II ainsi que l'ACTH augmentent la  $[Ca^{2+}]_i$  via des mécanismes différents. Premièrement, le potassium induit une augmentation immédiate de  $[Ca^{2+}]_i$ , tel qu'il avait été démontré antérieurement. Deuxièmement, l'angiotensine II induit une réponse biphasique caractérisée par: 1) une augmentation rapide et transitoire de  $[Ca^{2+}]_i$ . 2) une phase de plateau soutenue de  $[Ca^{2+}]_i$  qui provient d'un influx de  $Ca^{2+}$  via des canaux calciques dépendant du voltage. Enfin nous avons démontré que l'ACTH induit une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules glomérulées. Le profil d'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoqué par l'ACTH peut être divisé en deux phases: 1) un temps de latence d'environ 10 à

15 min avant que l'on puisse voir apparaître l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . 2) la seconde est l'augmentation lente et progressive de  $[Ca^{2+}]_i$  qui est le résultat d'un influx de calcium via des canaux calciques. De plus, en absence de calcium externe, aucune augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  n'a été observée suite à une stimulation à l'ACTH.

L'utilisation de la technique d'imagerie nous a permis d'examiner la distribution spatiale des changements de  $[Ca^{2+}]_i$  dans un groupe de cellules. La capacité d'enregistrer des images d'un petit nombre de cellules confirme l'hétérogénéité des réponses cellulaires, et corrobore les résultats obtenus par la microspectrofluorométrie.

Dans ce travail, nous avons fait des études sur les effets de fragments de l'ACTH, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub>, sur la sécrétion de stéroïdes et la production d'AMPC. Les résultats obtenus démontrent que ceux-ci stimulent la sécrétion de stéroïdes mais à des doses très élevées. La présence simultanée des deux fragments n'a pas recouvré l'effet de la molécule entière. Aucun des fragments, seuls ou combinés, n'a stimulé la production d'AMPC. Ceci suggère que l'intégrité moléculaire de l'ACTH est essentielle pour l'obtention d'une stimulation et d'une production de stéroïdes et d'AMPC, respectivement.

A l'aide de la microspectrofluorométrie et de l'imagerie, nous avons montré pour la première fois que l'ACTH augmente la  $[Ca^{2+}]_i$  via des canaux calciques. L'AMPC et les PKA ont un rôle primordial à jouer lors de cette augmentation.



## 1- INTRODUCTION

### 1. Description de la structure du cortex surrénalien.

#### 1.1. Rappel sur la morphologie.

Chez le rat, la glande surrénale est de forme ovoïde et située au-dessus de chaque rein. La surrénale est divisée en deux parties: le cortex à l'extérieur et la médulla au centre. Le cortex est formé de trois zones: la zone glomérulée, la plus externe et la plus étroite (5 à 6 couches de cellules), la zone fasciculée, la plus large (30 à 40 couches de cellules) et la zone réticulée, qui est en contact avec la médulla (figure 1). Certains auteurs ont décrit une quatrième zone, chez le rat et d'autres espèces, appelée zone intermédiaire, située entre la zone glomérulée et fasciculée. Les auteurs n'ont pas encore défini le rôle de cette zone (NUSSDORFER, 1980).

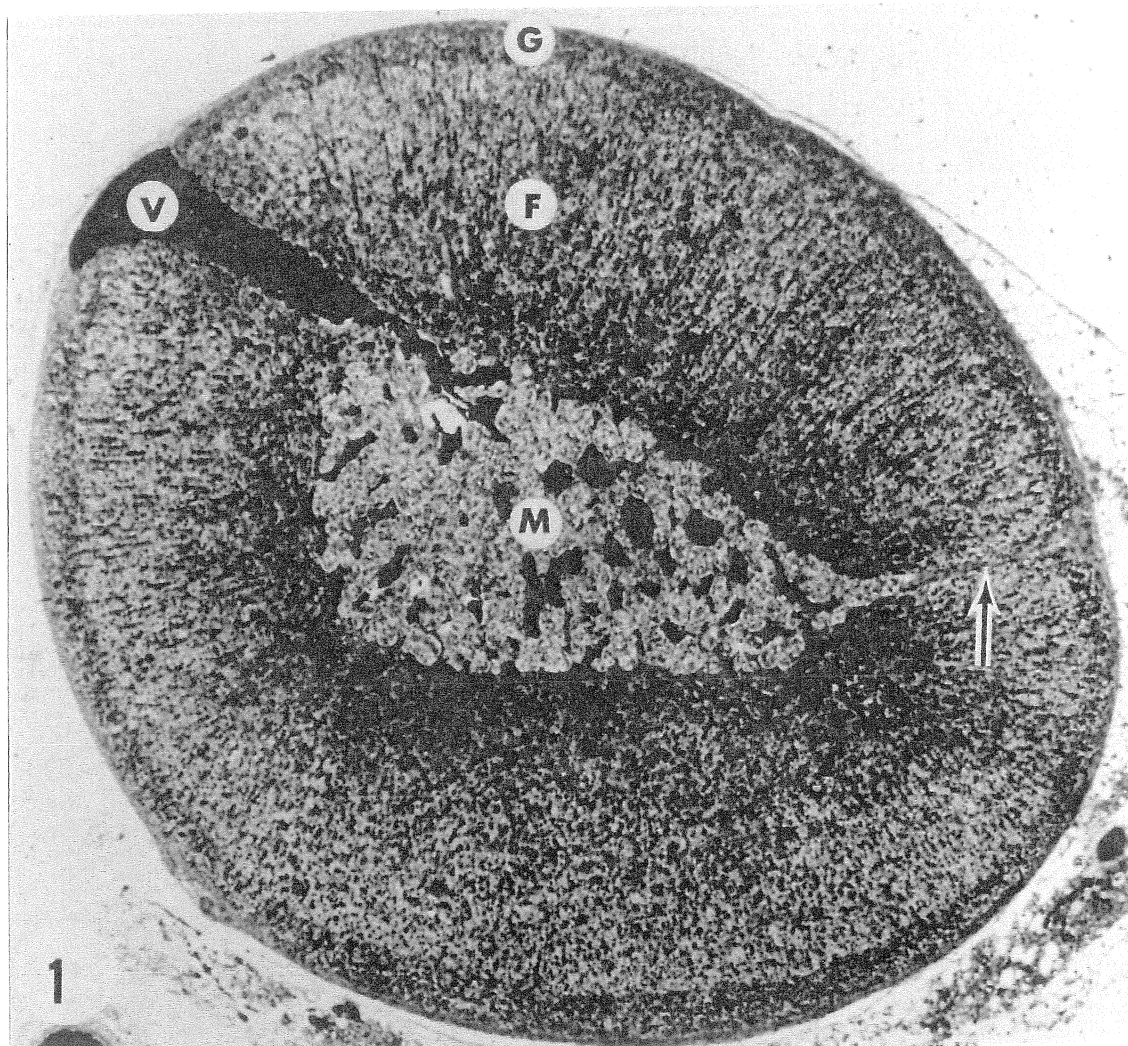
#### 1.2. Ultrastructure de la zone glomérulée.

Plusieurs auteurs ont décrit l'ultrastructure de la zone glomérulée (IDELMAN, 1970; NUSSDORFER, 1980). La zone glomérulée est composée de 5 à 6 couches de cellules arrangées de façon irrégulière et occupant environ 10 à 15% du volume de la glande. Les cellules possèdent un noyau rond ou oval avec

Figure 1: Section entière d'une glande surrénale de rat femelle. Au centre on peut voir la médulla (M), qui est entourée par le cortex formée de trois zones: la zone glomérulée (G), la plus externe et la plus étroite, la zone fasciculée (F), la plus large, et la zone réticulée qui est en contact la médulla.

X33

Tirée de PAYET (1981)





un nucléole évident (RHODIN, 1971) et à l'occasion on peut observer des mitoses, surtout dans la partie interne de la zone.

Dans les cellules glomérulées, les mitochondries sont nombreuses et occupent 25 à 30% du volume cytoplasmique. Elles sont de forme allongée et présentent des crêtes de forme tubulaire.

Le réticulum endoplasmique lisse (SER) est abondant, occupant 35 à 40% du volume cytoplasmique. Il forme un réseau de tubules anastomosés qui entoure fréquemment les mitochondries ainsi que les gouttelettes lipidiques. Le SER semble mieux développé dans les cellules des portions externe et interne de la zone glomérulée que dans la portion sous-capsulaire. Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est beaucoup plus rare ou complètement absent (RHODIN, 1971). Par contre, plusieurs ribosomes libres ont été observés.

Les gouttelettes lipidiques occupent 6 à 10% du volume cytoplasmique et semblent beaucoup plus abondantes dans la portion interne de la zone glomérulée.

L'appareil de Golgi est toujours présent, soit petit et clairsemé (RHODIN, 1971), ou soit bien développé (WASSERMANN et WASSERMANN, 1974). Il est composé de plusieurs citernes et de nombreuses vésicules.

Les cellules de la zone glomérulée possèdent un important réseau de microtubules et de microfilaments au niveau de la membrane plasmique (GABBIANI et coll., 1975).

## 2. Fonction de la zone glomérulée.

### 2.1. Synthèse des minéralocorticoïdes.

Les différentes zones du cortex surrénalien synthétisent et sécrètent des hormones qui leur sont spécifiques. La zone glomérulée est le site de synthèse des minéralocorticoïdes, le plus important étant l'aldostérone et la corticostérone (VINSON et WHITEHOUSE, 1973). La zone fasciculée, quant à elle, synthétise des glucocorticoïdes qui sont impliqués dans le métabolisme du glucose. Le principal glucocorticoïde est la corticostérone chez le rat et le cortisol chez l'homme. La zone réticulée est le site de synthèse de glucocorticoïdes, mais aussi d'androgènes, tel le déhydroépiandrostérone et son dérivé sulfaté.

La biosynthèse de l'aldostérone a été largement étudiée par MULLER (1971 et 1980). Il a été montré aussi que la corticostérone n'est pas un intermédiaire indispensable dans la conversion de la progestérone en aldostérone, mais que la déoxycorticostérone peut être hydroxylée en position 18 pour donner la 18-hydroxy-11-déoxycorticostérone (GREKIN et coll., 1973; MULLER, 1980). Une autre étude menée par HAUSLER et coll. (1989), a montré que le puissant inhibiteur de l'aromatase, le CGS 16949A, pouvait inhiber la biosynthèse de l'aldostérone "in vitro". Ils ont montré que lorsque la biosynthèse est inhibée, il y a une accumulation de 11-

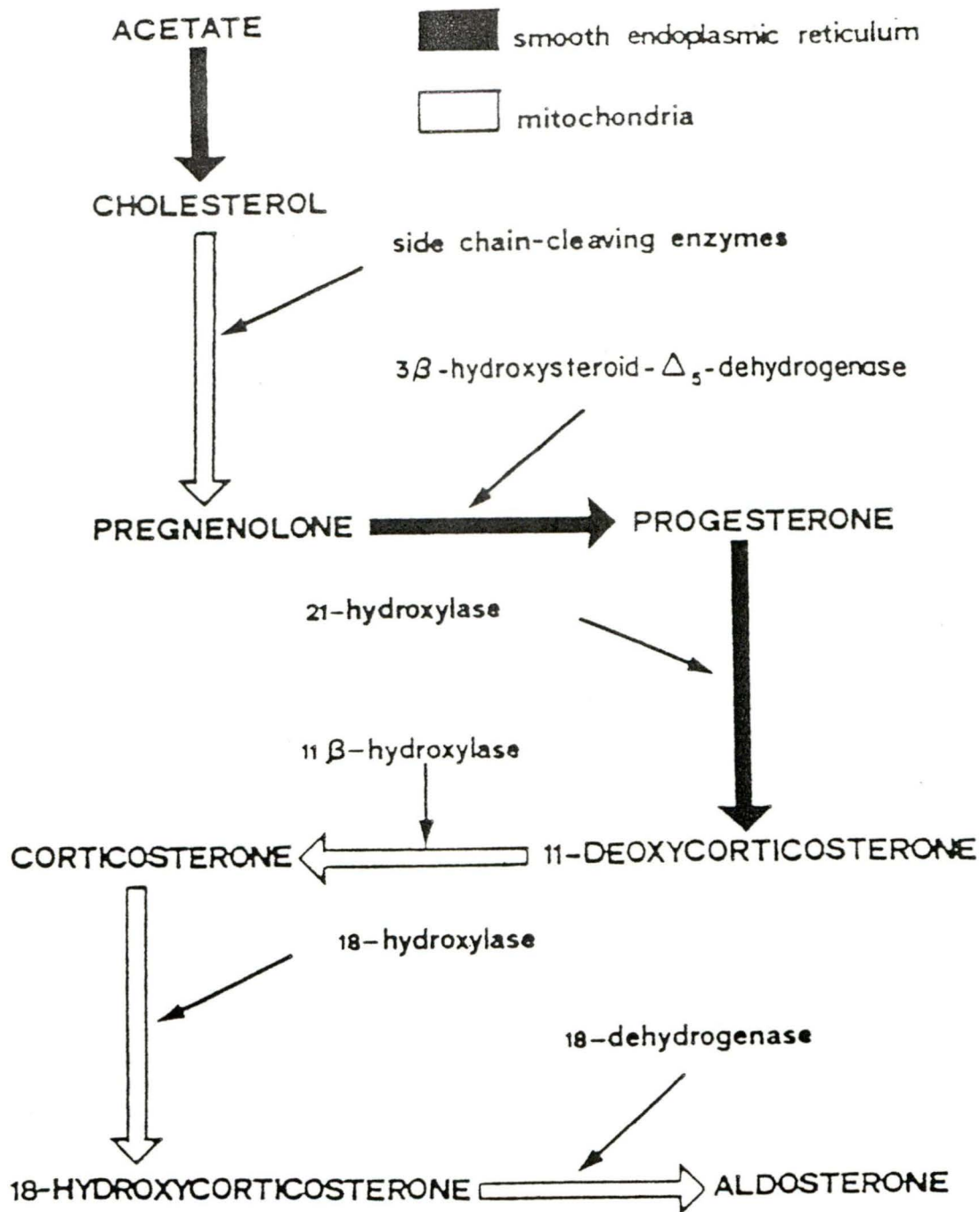
déoxycorticostérone, mais sans affecter la production de corticostérone, indiquant que cette dernière n'est pas essentielle à la transformation de la 11-déoxycorticostérone en aldostérone.

## 2.2. Mécanisme intracellulaire de la synthèse de l'aldostérone.

L'aldostérone a été isolée par SIMPSON et coll. (1953), et depuis ce temps les connaissances acquises sur le mécanisme de la synthèse de l'aldostérone ont été décrites dans plusieurs revues (LEHOUX, 1979; ONTJES, 1980; NUSSDORFER, 1980). Les enzymes impliqués dans la synthèse de l'aldostérone sont localisés dans le SER et les mitochondries. La figure 2 nous montre les différentes étapes de la synthèse ainsi que les sites où elles ont lieu. La molécule qui sert de précurseur à la synthèse de l'aldostérone, mais aussi de tous les stéroïdes, est le cholestérol. Celui-ci provient de trois sources: la première est le cholestérol qui vient du plasma, la seconde est le cholestérol emmagasiné dans les gouttelettes lipidiques sous forme d'ester, et la dernière est le cholestérol provenant d'une synthèse de novo à partir de l'acétate. Chez le rat, la source de cholestérol est surtout exogène.

Les molécules de cholestérol libre entrent dans la mitochondrie où des enzymes hydroxylantes (complexe desmolase)

Figure 2: Schéma simplifié illustrant les étapes de la biosynthèse de l'aldostérone. D'après NUSSDORFER (1980).





les transforment en prégnénolone. Par la suite, la prégnénolone passe des mitochondries au SER, où elle sera transformée en progestérone. Puis celle-ci est hydroxylée en position 21 par la 21-hydroxylase pour donner la 11-déoxycorticostérone (DOC). Cette DOC entre de nouveau dans les mitochondries où elle sera convertie en corticostérone par la 11- $\beta$ -hydroxylase. La corticostérone subit deux autres réactions enzymatiques pour donner l'aldostérone. Toutes ces réactions sont catalysées par l'enzyme P-450 dont il existe plusieurs formes (SIMPSON et coll., 1986). Il est clair que la zone glomérulée possède une machinerie enzymatique plus complexe que la zone fasciculée, puisque le produit final de cette dernière est la corticostérone.

### 2.3. Mécanisme de sécrétion des minéralocorticoïdes.

Selon NUSSDORFER et coll. (1978b), il n'y a peu ou pas d'emmagasinement intracellulaire d'hormone à l'intérieur de la cellule. D'après eux, les hormones sont sécrétées aussitôt synthétisées. Le mécanisme de sécrétion est encore aujourd'hui très controversé. Dans la littérature, on retrouve deux écoles de pensée au sujet du mode de sécrétion des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes: la première est celle de la simple diffusion de l'hormone (LEVER, 1955) et la seconde est celle du mécanisme d'exocytose grâce à des vésicules de sécrétion (RUBIN et coll., 1974; NUSSDORFER et



coll., 1978b; BASSET et POLLARD, 1980) ou à des protéines de transport (ALI et BASSETT, 1991). D'après ces auteurs les hormones semblent être sécrétées immédiatement après leur synthèse.

#### 2.4. Effets physiologiques de l'aldostérone.

L'aldostérone a comme rôle principal de contrôler la rétention du sodium et l'excrétion de potassium au niveau du rein, mais aussi au niveau des glandes salivaires, sudoripares et intestinales. Dans le rein, l'aldostérone agit principalement sur le tubule distal et aussi sur l'anse de Henley et le tubule proximal mais à un degré moindre (LIDDLE, 1981).

#### 3. Régulation de la sécrétion d'aldostérone.

Alors que la sécrétion de corticostérone dans la zone fasciculée est presque exclusivement contrôlée par l'ACTH, la régulation de la sécrétion d'aldostérone est très complexe. Non seulement il y a plus d'une douzaine de facteurs impliqués, mais ceux-ci exercent leurs effets via presque tous les mécanismes de transduction connus. Parmi ces facteurs, on retrouve les taux sanguins en potassium et sodium, la volémie, le système rénine-angiotensine, les hormones hypophysaires et d'autres facteurs stimulant la sécrétion d'aldostérone. De

nombreuses revues ont décrit l'effet de ces différents facteurs (MULLER, 1971; MULLER, 1974; LEHOUX, 1979; ONTJES, 1980; QUINN et WILLIAMS, 1988).

### 3.1. Rôle des ions.

#### 3.1.1. Potassium

Le potassium est considéré comme l'un des plus importants régulateurs de la synthèse et de la sécrétion de l'aldostérone. De nombreux travaux ont montré son importance dans cette synthèse d'aldostérone aussi bien chez l'homme (WILLIAMS et DLUHY, 1972; SCHOLER et coll., 1973) que chez les animaux (TAIT et coll., 1972; McCAA et coll., 1975; FREDLUND et coll., 1977; BING et SCHULSTER, 1977; BRALEY et WILLIAMS, 1977 et 1978; CAMPBELL, 1982a et b; MULLER et coll., 1989). Ces études ont montré que de faibles augmentations de la concentration en potassium plasmatique induisait une augmentation de la sécrétion d'aldostérone. En effet, dans la plupart des études réalisées sur des cellules isolées, le passage de 3 à 5 et 7 mM de  $K^+$  dans le milieu d'incubation double la sécrétion d'aldostérone et des concentrations plus élevées que 10 mM l'inhibe, bien qu'une étude récente ait montré que la sécrétion d'aldostérone augmentait jusqu'à une concentration de 50 mM de  $K^+$  (MULLER, 1989).

Des études récentes montrent que le potassium provoque

des changements rapides dans le potentiel de membrane et stimule un influx de calcium via des canaux calciques dépendant du voltage (CAPPONI et coll., 1984; KOJIMA et coll., 1985; QUINN et coll., 1987; CAPPONI et coll., 1987; COHEN et coll., 1988; SPAT et coll., 1989; PRATT et coll., 1989; BALLA et coll., 1991). Cet influx de calcium résulte en une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  libre qui induirait la stimulation de production et sécrétion d'aldostérone (CAPPONI et coll., 1984; BRALEY et coll., 1986; CONNOR et coll., 1987).

Les résultats concernant l'effet du potassium sur l'AMPc sont controversés (FUJITA et coll., 1979; HYATT et coll., 1986). Mais de plus en plus d'observations suggèrent que le potassium affecte la production d'AMPc. Ainsi donc, le potassium est un régulateur très important de la sécrétion de l'aldostérone.

### 3.1.2. Sodium

Plusieurs travaux ont décrit l'importance de la concentration plasmatique en sodium dans la régulation de la sécrétion de l'aldostérone (MULLER, 1971; BLAIR-WEST et coll., 1973; LEHOUX et coll., 1974; AGUILERA et coll., 1978). La conclusion qui ressort de ces travaux est que la restriction en sodium induit une augmentation de la production d'aldostérone, et qu'un surplus sodique la diminue.

Lors d'expériences effectuées sur un groupe d'animaux



soumis à une diète déficiente en sodium et enrichie en potassium, et sur un autre groupe soumis à une diète enrichie en potassium seulement, le premier groupe a synthétisé plus d'aldostérone que le second (DEBRECENI et CSETE, 1975).

Plusieurs études réalisées "in vitro" suggèrent que l'action du sodium sur la production d'aldostérone n'est pas directe, mais est plutôt médiée par le potassium ou l'angiotensine II (BOYD et coll., 1971; KOTCHEN et coll., 1983). Sur cellules isolées, les variations en  $\text{Na}^+$  ne modifient pas la sécrétion d'aldostérone.

Il est établie depuis longtemps que le sodium est relié au système rénine-angiotensine. Une baisse dans la concentration en sodium induit une libération de la rénine (GROSS et coll., 1965). La rénine agit par la suite sur la production d'angiotensine II (SKORNICK et PALADIN, 1964). Plus récemment, UNDERWOOD et coll.(1989) ont suggéré que l'augmentation de la sensibilité des cellules glomérulées à l'angiotensine II, lors d'une restriction sodique, est due en partie à une augmentation du relâchement des composés du système des phosphoinositides. Ils ont montré que le niveau de base du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) était doublé lors d'une diète déficiente en sodium, suggérant que la modification de la sensibilité serait reliée au changement dans la concentration de ce substrat. Ces mêmes auteurs ont démontré que les effets de l'ACTH sont accrus lors d'une

restriction sodique, tandis que l'effet du  $K^+$  reste inchangé.

Les résultats décrits dans ce paragraphe montrent encore une fois que la régulation de la sécrétion d'aldostérone implique plusieurs facteurs lors d'une restriction sodique.

### 3.1.3. Calcium

Plusieurs études ont démontré l'importance du calcium dans l'action des stimuli sur la zone glomérulée. BOWYER et KITABACHI (1974) ont montré que l'ACTH, à une concentration physiologique, a besoin de la présence de calcium pour provoquer une action sur la surrénale. En absence de calcium, il faut une concentration 10 000 fois plus forte pour reproduire le même effet. D'autres auteurs ont mentionné que le calcium est indispensable d'une part pour la liaison de l'ACTH à son récepteur et pour le maintien du complexe ACTH-récepteur (CHEITLIN et coll., 1985), et d'autre part il est nécessaire pour l'interaction entre le complexe récepteur-protéine  $G_s$  avec la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase (MAHAFFEE et ONTJES, 1980; SAEZ et coll., 1981). C'est pour ces raisons que SAEZ et coll.(1981) ont proposé qu'au niveau membranaire, le calcium pourrait être considéré comme le premier "second messenger" de l'ACTH.

D'autres auteurs ont étudié l'effet du calcium, soit en absence de calcium (FAKUNDING et coll., 1979; FAKUNDING et CATT, 1980 et 1982; SCHIFFRIN et coll., 1981; RADKE et coll.,



1989), ou soit à l'aide d'inhibiteurs de canaux calciques, tels la nifédipine ou nitrendipine (MILLAR et coll., 1981 et 1983; CAPPONI et coll., 1984; PRATT et coll., 1989; RADKE et coll., 1989) sur les actions de l'angiotensine II et du potassium sur la production d'aldostérone. Leurs résultats montrent que l'angiotensine II et le potassium agissent via un mécanisme dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ . Plusieurs auteurs arrivent à la conclusion que ces deux stimuli utiliseraient deux mécanismes différents (LOBO et MARUSIC, 1982; CAPPONI et coll., 1984; PRATT et coll., 1989; RADKE et coll., 1989).

### 3.2. Rôle du système rénine-angiotensine.

"In vivo", le système rénine-angiotensine reste le principal modulateur de la sécrétion d'aldostérone. Plusieurs études ont mis en évidence que l'angiotensine II stimule la production d'aldostérone, aussi bien "in vivo" (BLAIR-WEST et coll., 1963; SCHOLER et coll., 1973; NICHOLLS et coll., 1983) que "in vitro" (PEYTREMANN et coll., 1974; TAIT et coll., 1974 et 1980; FREDLUND et coll., 1975 et 1977; BING et SCHULSTER, 1977; MENDELSON, 1979 et 1980; KRAMER et coll., 1980; PAYET, 1981; CAPPONI et coll., 1984). Toutes ces études ont montré que l'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone de 2 à 4 fois. Le rôle de l'angiotensine II sur la zone fasciculée varie selon les espèces. Chez le boeuf et l'homme, l'angiotensine II stimule la sécrétion de cortisol, alors que

chez le rat, l'angiotensine II ne stimule pas la sécrétion de corticostérone (PAYET, 1981; DOUGLAS et coll., 1984).

### 3.3. Rôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH).

De nombreuses expériences réalisées "in vitro" ont démontré que l'ACTH est le plus puissant stimulus des sécrétions de corticostérone et d'aldostérone (HANING et coll., 1970; MULLER, 1971; FREDLUND et coll., 1975 et 1977; BING et SCHULSTER, 1977; DOUGLAS et coll., 1978; PAYET, 1981; FARESE et coll., 1983a). Selon ces études, les taux de stimulation varient de 3 à 10 fois pour l'aldostérone et de 4 à 6 fois pour la corticostérone. Par contre, certains auteurs ont trouvé des taux de stimulation allant de 25 à 30 fois pour l'aldostérone et de 1000 fois pour la corticostérone (GALLO-PAYET et PAYET, 1989; BING et SCHULSTER, 1977; DOUGLAS et coll., 1978).

### 3.4. Autres facteurs.

Plusieurs autres facteurs sont reconnus pour avoir un effet sur la sécrétion de l'aldostérone. Parmi eux, on retrouve la vasopressine, dont l'effet le plus connu est son action antidiurétique et vasoconstrictrice (KURTZMAN et BOONJAREN, 1975). Il a été démontré que la vasopressine a

une activité mitotique au niveau de la zone glomérulée (PAYET et ISLER, 1976; PAYET et LEHOUX, 1980), mais aussi qu'elle peut stimuler la production d'aldostérone sur des suspensions cellulaires (WOODCOCK et coll., 1990; PAYET, 1981) et sur des cultures primaires (PAYET et coll., 1984).

Il y a encore de nombreux facteurs qui peuvent stimuler la sécrétion d'aldostérone, comme la sérotonine (5-hydroxytryptamine) (MULLER et ZIEGLER, 1968; TAIT et coll., 1972 et 1980; MENDELSON et KACHEL, 1981; WILLIAMS et coll., 1981; ROCCO et coll., 1990), l' $\alpha$ -MSH (VINSON et coll., 1980 et 1981; SZALAY et STARK, 1982; LI et coll., 1982), le  $\beta$ -MSH (MATSUOKA et coll., 1981a; YAMAKADO et coll., 1982), la  $\beta$ -lipotropine (MATSUOKA et coll., 1981b; WASHBURN et coll., 1982), l'interleukine-1 (WINTER et coll., 1990), ainsi que l'endothéline (ROSOLOWSKY et CAMPBELL, 1990).

D'autres facteurs sont connus pour inhiber la sécrétion d'aldostérone, tels le facteur natriurétique cardiaque (ANF) (CHARTIER et coll., 1984) et la dopamine (MISSALE et coll., 1986), ainsi que le "Tumor Necrosis Factor" (TNF) (NATARAJAN et coll., 1989).

#### 4. Couplage excitation-sécrétion.

##### 4.1. Introduction

Lorsque l'on parle de couplage excitation-sécrétion ceci implique deux phénomènes. Tout d'abord il y a la liaison entre l'hormone et son récepteur, et ensuite la sécrétion de substances médiatrices par la cellule. Mais entre ces deux phénomènes d'excitation et de sécrétion, il y a plusieurs autres mécanismes impliqués. Cette terminologie de couplage excitation-sécrétion a été proposée par DOUGLAS et coll. (1968), lors de travaux effectués sur la sécrétion de catécholamines par l'acétylcholine sur des cellules chromaffines de la médulla.

##### 4.2. Rôle du calcium dans le mécanisme d'action des hormones.

###### 4.2.1. Cas de l'ACTH

Le rôle du calcium dans le mécanisme d'action de l'ACTH a été le sujet de nombreuses recherches depuis les 25 dernières années. Il a été démontré que le  $\text{Ca}^{2+}$  est aussi important dans la liaison de l'ACTH à son récepteur qu'à la production d'AMPC et sur la stimulation de la stéroïdogénèse.

Des études réalisées par CHEITLIN et coll. (1985) ont



montré que le  $\text{Ca}^{2+}$  est requis non seulement pour l'association de l'ACTH à son récepteur mais aussi pour maintenir l'occupation de celui-ci. D'autres études ont montré que le  $\text{Ca}^{2+}$  facilite le couplage du complexe hormone-récepteur aux protéines G ainsi que la liaison du GTP à la protéine G.

FAKUNDING et coll. (1979) et FAKUNDING et CATT (1980) ont étudié le rôle du calcium extracellulaire et celui des inhibiteurs de canaux calciques sur des cellules glomérulées lors d'une stimulation avec l'ACTH ou d'AMPc. Leurs résultats montrent qu'une réduction de la concentration du calcium extracellulaire diminue la production de stéroïdes et d'AMPc. Les effets des inhibiteurs de canaux calciques réduisent de manière dose-dépendante la production de stéroïdes. Ces résultats montrent bien que le calcium joue un rôle dans le couplage ACTH-récepteur et l'adénylate cyclase.

Outre l'AMPc considéré comme le principal second messenger, certains chercheurs ont montré que l'ACTH pouvait stimuler la production d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) sur des cellules glomérulées et fasciculées du cortex surrénalien (FARESE et coll., 1986; GALLO-PAYET et PAYET, 1989; BIRD et coll., 1990). Leurs résultats montrent que l'ACTH, à des concentrations se situant entre  $10^{-14}$  et  $10^{-11}$  M, augmente la production d' $\text{IP}_3$  à l'intérieur des cellules et qu'à des concentrations supérieures à  $10^{-10}$  M, l'ACTH stimule la production d'AMPc. FARESE et coll. (1986) ont montré que l'ACTH augmente la concentration de calcium intracellulaire



aux mêmes concentrations que celles qui augmentent la production d' $\text{IP}_3$ . GALLO-PAYET et PAYET (1989) ont trouvé que l'ACTH ( $10^{-11}$  et  $10^{-8}$  M) stimule un influx de calcium chez les cellules glomérulées. KOJIMA et OGATA (1986) ont montré que l'ACTH augmente rapidement et transitoirement la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mais sans générer d' $\text{IP}_3$ . Les auteurs affirment que la mobilisation de calcium qu'ils observent est d'origine extracellulaire. Ces résultats sur la production de seconds messagers montrent bien que l'AMPC n'est pas le seul "second messenger" lors de la stimulation par l'ACTH, mais que le calcium y est largement impliqué dans l'action de celui-ci.

Depuis plusieurs années, le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux calciques dépendant du voltage joue un rôle de plus en plus important dans le processus de couplage excitation-sécrétion. Avec l'aide de la technique de patch-clamp (HAMILL et coll., 1981), PAYET et coll. (1987) ont analysé les courants ioniques à travers la membrane cellulaire de cellules glomérulées. Ils ont trouvé que ces cellules possèdent des canaux potassiques et calciques dépendants du voltage avec l'aide d'inhibiteurs sélectifs à chaque canal. Ils ont aussi montré que l'ACTH bloque un courant potassique sortant, et que le tétraéthylammonium (TEA), un bloqueur de canaux potassiques dépendant du voltage, bloque ce courant. Ainsi, la dépolarisation de la membrane cellulaire induite par l'ACTH peut être médiée par ce blocage du courant  $\text{K}^+$  sortant. Dans une autre étude, DURROUX et coll. (1988) ont montré que les

cellules glomérulées possèdent trois types de canaux calciques, c'est-à-dire le canal de type "T", pour courant transitoire, le canal de type "L", pour courant lent et enfin le courant de type "N", pour ni "T" ni "L". Le canal de type "L" est souvent appelé aussi le canal sensible aux dihydropyridines. Dans une étude récente, DURROUX et coll. (1991) ont montré que l'analogue de l'AMPC perméable aux cellules, le 8-bromo-AMPC, augmente l'amplitude des canaux calciques de type "L". GALLO-PAYET et PAYET (1989) ont aussi montré que le TEA, ainsi que l'ACTH à de faibles concentrations, stimulent un influx de calcium, l'accumulation d' $IP_3$  ainsi que la sécrétion de stéroïdes.

Tous ces résultats démontrent bien l'existence de plus d'un second messenger dans l'action de l'ACTH. Il est clair que le  $Ca^{2+}$  participe comme médiateur dans la réponse à l'ACTH dans les cellules glomérulées.

SAEZ et coll. (1974) ont effectué des études de liaison avec différents analogues de l'ACTH sur des membranes plasmiques de surrénales de rat, de mouton et d'humain. Il ressort de ces études que la partie C-terminale,  $ACTH_{11-24}$ , est essentielle à la liaison de l'hormone à son récepteur, et que la partie N-terminale,  $ACTH_{1-10}$ , en plus d'être active biologiquement, contribue aussi à la liaison de l'hormone à son récepteur. Ils ont aussi effectué des expériences sur l'activation de l'adénylate cyclase et ont observé que l' $ACTH_{1-10}$  stimulait la production d'AMPC tandis que l' $ACTH_{11-24}$  ne la

stimulait pas.

Li et coll. (1989) ont montré aussi que l'ACTH<sub>1-10</sub> stimule l'adénylate cyclase alors que l'ACTH<sub>11-24</sub> ne stimule pas l'enzyme. Ces auteurs ont proposé que l'ACTH<sub>1-10</sub> stimule la stéroïdogénèse via un récepteur couplé à l'AMPC et l'ACTH<sub>11-24</sub> via l'activation d'un récepteur lié à un autre système d'effecteur, probablement le calcium.

La controverse demeure en ce qui concerne le récepteur de l'ACTH, à savoir s'il y a un ou deux sites de liaison, ou encore deux récepteurs, chacun couplé à un système de second messenger différent. Ce qui est clairement établi maintenant, c'est que le calcium y est impliqué dans la réponse enregistrée.

#### 4.2.2. Cas de l'angiotensine II.

Les premières études réalisées sur le mécanisme d'action de l'angiotensine II ont montré que l'action de cette hormone est dépendante du calcium extracellulaire, et que l'AMPC ne semble pas intervenir (DOUGLAS et coll., 1978).

Des études de liaison de l'angiotensine II avec différentes concentrations de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, ont montré que le calcium ne joue aucun rôle sur la liaison de l'hormone à son récepteur (FAKUNDING et coll., 1980).

Des études réalisées par FARESE et coll. (1983a) ont montré que l'angiotensine II active l'hydrolyse des



phosphatidylinositols en diacylglycérol et en inositoltriphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Par la suite, l' $\text{IP}_3$  entraîne une mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

Dans un article de revue de BARRETT et coll. (1989), les auteurs décrivent le mécanisme d'action de l'angiotensine II, ainsi que le rôle du calcium dans ce mécanisme, tel que représenté schématiquement à la figure 3.

Les auteurs séparent l'action de l'angiotensine II en deux phases: initiale et soutenue. Dans la phase initiale, la liaison de l'angiotensine II à son récepteur provoque, via une protéine liant le GTP (protéine G), l'hydrolyse de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) par la phospholipase C (PLC) pour générer de l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Par la suite, l' $\text{IP}_3$  induit une élévation transitoire du calcium intracellulaire ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ), lequel active les protéines  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline résultant en une augmentation transitoire de la phosphorylation de phosphoprotéines de la phase précoce ( $\text{Pr}_1\cdot\text{P}$ ) et une augmentation de la sécrétion d'aldostérone. Dans la phase soutenue, en plus de  $\text{PIP}_2$ , le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylcholine (PC) peuvent être hydrolysés soit par une phospholipase C (PLC) ou soit par une phospholipase D (PLD) pour générer non seulement les IP mais aussi une augmentation soutenue en diacylglycérol (DG) de la membrane plasmique. L'angiotensine II provoque aussi une augmentation de l'influx calcique (via des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage) et une augmentation de l'efflux de

Figure 3: Schéma illustrant tous les effecteurs impliqués dans la régulation de la biosynthèse de l'aldostérone lors d'une stimulation par l'angiotensine II. D'après BARRETT (1990).

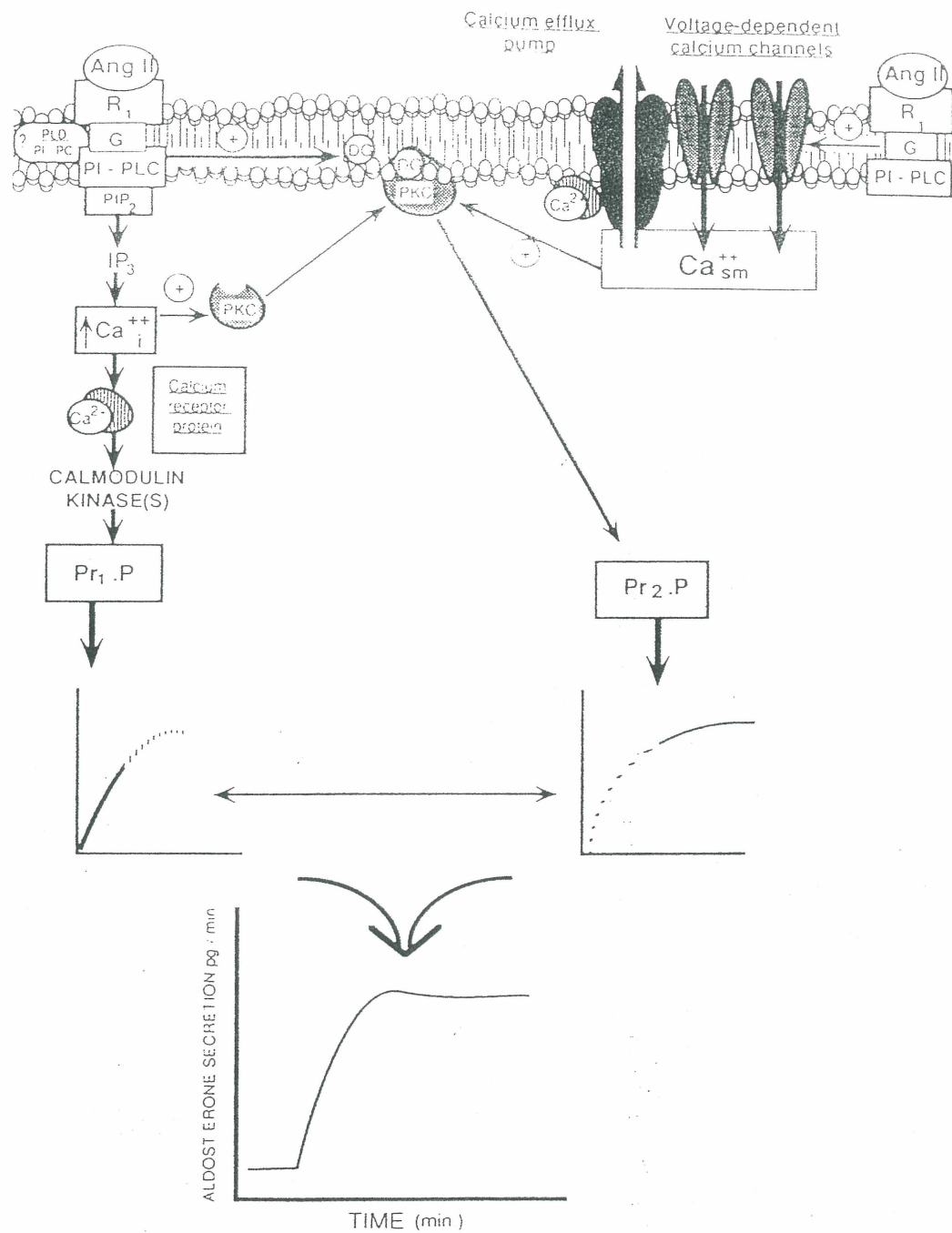
PLC: Phospholipase C

PLD: Phospholipase D

PKC: Protéine kinase C

G : Protéine G





$\text{Ca}^{2+}$  (via la stimulation de l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ ). Un couplage imparfait entre l'influx et l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  peut résulter en une élévation dans la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  sous-membranaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ ). En conjonction avec le DG, cette augmentation dans la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$  induit l'activation de la PKC, une augmentation soutenue de la phosphorylation de phosphoprotéines de la phase soutenue ( $\text{Pr}_2\cdot\text{P}$ ) et une stéroïdogénèse soutenue. L'influx calcique impliquerait une protéine G de type  $G_i$  sensible à la toxine de Bordetella Pertussis (HAUSDORFF et coll., 1987; ENYEDI et coll., 1986; KOJIMA et coll., 1986) alors que l'activation de la PLC impliquerait une protéine G sensible ni à la toxine de Pertussis et ni à la toxine de choléra (GUILLON et coll., 1988).

D'après ces résultats, il est maintenant clair que le  $\text{Ca}^{2+}$  sert de messenger intracellulaire dans l'action de l'angiotensine II dans la cellule glomérulée de la surrénale.

#### 4.2.3. Cas de l'ion potassium.

Lorsque le potassium stimule la sécrétion d'aldostérone, il agit aussi via le système de second messenger du calcium (FAKUNDING et coll., 1979; KOJIMA et coll., 1985). Dans le cas du  $\text{K}^+$ , le calcium utilisé dans le couplage excitation-sécrétion provient exclusivement d'une source extracellulaire (KOJIMA et coll., 1985). De petits changements dans la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 4 à 6-8 mM) causent

une dépolarisation de la membrane plasmique des cellules glomérulées (FOSTER et coll., 1982). KOJIMA et coll. (1985b) ont observé que le calcium entre via un canal calcique dépendant du voltage. En plus de son effet sur l'entrée du calcium, une augmentation de la concentration du  $K^+$  cause une légère activation de l'adénylate cyclase. Ainsi des changements dans le calcium intracellulaire et la concentration d'AMPC jouent un rôle dans la régulation de la sécrétion d'aldostérone.

#### 4.3. Mesures de la $[Ca^{2+}]_i$ libre.

La concentration de calcium à l'intérieur du cytosol contrôle plusieurs processus cellulaires vitaux: contraction musculaire, neurotransmission, exocytose. Jusqu'à tout récemment, les techniques pour mesurer le calcium libre étaient très ardues et applicables à quelques types cellulaires seulement.

TSIEN (1981) a mis au point un indicateur fluorescent spécifique au calcium, le QUIN 2, qui a été un point tournant dans la mesure de calcium intracellulaire. Cet indicateur, sous sa forme estérifié, a la propriété de pouvoir traverser la membrane cellulaire et de rester piéger à l'intérieur des cellules lorsque des estérases non-spécifiques hydrolysent le groupement ester. A ce moment-là, l'indicateur se retrouve sous sa forme acide, et ne peut plus traverser la membrane.

Un autre avantage du QUIN 2 est sa haute affinité pour le calcium. Le QUIN 2 a quelques désavantages, comme sa longueur d'onde d'excitation trop courte (339 nm), sa production de fluorescence trop faible, et il n'y a aucun déplacement des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission lorsque le QUIN 2 se lie au calcium.

Mais GRYNKIEWICZ et coll. (1985) ont mis au point un nouvel indicateur fluorescent de calcium, le FURA 2, un dérivé du QUIN 2. Le FURA 2 a le même pouvoir de pénétration que le QUIN 2, sauf qu'il est encore plus spécifique au calcium que le QUIN 2. Le principal avantage du FURA 2, c'est que celui-ci possède deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nm) et une seule longueur d'onde d'émission (510 nm). Ceci permet d'effectuer un rapport entre la lumière émise lors de l'excitation à 340 nm et celle à 380 nm comme mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les rapports obtenus sont convertis en valeur de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'aide d'une calibration appropriée (TSIEN et POENIE, 1986). Pour ces raisons le FURA 2 est devenu le marqueur le plus populaire et le plus largement utilisé dans les laboratoires travaillant sur les mesures de calcium intracellulaire. GRYNKIEWICZ et coll. (1985) ont mis au point un autre indicateur, l'INDO 1. Celui-ci contrairement au FURA 2, possède une seule longueur d'onde d'excitation mais deux longueurs d'onde d'émission.



#### 4.3.1. Utilisation du FURA 2 sur différents types cellulaires.

##### 4.3.1.1. Mesures de $[Ca^{2+}]_i$ sur population de cellules.

Depuis la synthèse du FURA 2 par GRYNKIEWICZ et coll. (1985), de nombreux laboratoires l'ont utilisé pour effectuer des mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  sur plusieurs types cellulaires, vu la simplicité avec laquelle on peut le faire pénétrer dans les cellules. Des mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été effectuées sur des leucocytes (SCANLON et coll., 1987), des cellules chromaffines (STAUDERMAN et PRUSS, 1989), des cellules hypophysaires (WON et coll., 1990), des cellules glomérulées (CAPPONI et coll., 1987; BALLA et coll., 1991), etc. Toutes ces études ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation du calcium au niveau d'une population de milliers et même de millions de cellules. Avec l'arrivée de nouvelles technologies, il est maintenant possible d'effectuer des mesures de  $[Ca^{2+}]_i$  sur une seule cellule isolée.

##### 4.3.1.2. Mesure de $[Ca^{2+}]_i$ sur cellule unique.

###### 4.3.1.2.1. Microspectrofluorométrie.

La microspectrofluorométrie a permis, au cours des dernières années, de découvrir des phénomènes très importants



au niveau de la régulation du calcium intracellulaire. Le phénomène qui a été reporté le plus souvent est l'oscillation de la concentration de calcium intracellulaire suite à une stimulation, ou même à l'état basal. Ces oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été retrouvées dans plusieurs types cellulaires. SCHLEGEL et coll. (1987) ont trouvé que l'apparition d'un potentiel d'action dans une cellule hypophysaire s'accompagne d'oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , suite à l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage. JACOB et coll. (1988) ont montré des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  sur des cellules endothéliales suite à une stimulation avec l'histamine. Chez les cellules glomérulées de boeuf, on retrouve souvent des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  suite à une stimulation par l'angiotensine II (QUINN et coll., 1988; JOHNSON et coll., 1989). Ces oscillations peuvent être expliquées par l'existence de plusieurs pools intracellulaires de calcium régulés différemment: 1) un pool  $IP_3$  sensible, 2) un pool  $IP_3$  insensible, 3) un pool AMPc sensible (TSIEN et TSIEN, 1991). La microspectrofluorométrie a permis de mettre à jour un phénomène nouveau et très important au niveau cellulaire, mais celle-ci ne nous permet pas de visualiser et de localiser ces changements dans la cellule. Tout aussi récente que la microspectrofluorométrie, la technique d'imagerie ouvre une nouvelle fenêtre sur la signalisation ionique intracellulaire, en permettant de localiser les changements spatiaux de  $Ca_i$ .

#### 4.3.1.2.2. Mesure de $[Ca^{2+}]_i$ par imagerie.

La technique d'imagerie permet de visualiser et de localiser les changements de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans le temps au niveau d'une seule ou d'un petit groupe de cellules. TSIEN et POENIE (1986) ont montré des images enregistrées lors de la fertilisation d'un oeuf d'oursin, de l'interaction de lymphocytes T cytotoxiques avec des cellules cibles, et d'oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$ . Ces images d'une seule ou d'un groupe de cellules permettent de situer à l'intérieur de la cellule où s'effectue les changements de  $[Ca^{2+}]_i$ . De plus, toutes les cellules ne répondent pas de la même façon. CONNOR et coll. (1987) ont réalisé des études sur les cellules glomérulées de rat lors d'une stimulation avec soit l'angiotensine II ou du  $K^+$ . Leurs résultats montrent que les cellules glomérulées ont des réponses hétérogènes en  $Ca^{2+}$  cytosolique et que le degré de sensibilité aux divers agents varie considérablement lorsqu'on stimule les cellules avec de l'angiotensine II ou du  $K^+$ .

Ce qui ressort des études faites sur cellules uniques, que ce soit par la microspectrofluorométrie ou par la technique d'imagerie, est qu'aucune cellule ne répond de la même façon. Dans toutes les mesures effectuées sur tous les types cellulaires, on observe une certaine hétérogénéité de la réponse en  $Ca^{2+}$ . La présence et la fonction des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  est un autre phénomène qui est encore mal compris.

Mais à l'aide de ces nouvelles techniques de haute précision, la lumière sera bientôt faite sur le "pourquoi" de l'existence de tels phénomènes.

#### 5. But du travail.

Comme il a été démontré par GALLO-PAYET et PAYET (1989), l'ACTH peut stimuler, à certaines concentrations, les deux systèmes de signalisation intracellulaire: l'AMPC et la voie des inositolphosphates et calcium. Ils ont montré aussi que suite à la liaison de l'ACTH à son récepteur, il y a une augmentation de l'influx calcique. Toutes ces études ont été effectuées soit sur des cellules en culture ou sur des cellules isolées.

Le premier but de ce projet a été de vérifier que l'ACTH augmentait bien la concentration de calcium intracellulaire chez les cellules glomérulées de surrénales de rat et de boeuf, et d'élucider le mécanisme de cette  $[Ca^{2+}]_i$ . Pour effectuer nos mesures de calcium intracellulaire, il nous a fallu mettre au point deux techniques: la première a été d'obtenir des cultures de cellules sur lamelle de verre prétraitée avec un substrat. L'obtention de cultures cellulaires fonctionnelles devient un but important de ce projet. La seconde a été de mettre au point les techniques de mesures de calcium, c'est-à-dire la microspectrofluorométrie et l'imagerie. La mise au point et la calibration de celles-



ci ont été un autre point important de ce projet.

Dans notre étude, nous avons examiné l'effet des principaux sécrétagogues de l'aldostérone (angiotensine II, ACTH et  $K^+$ ) sur la concentration de calcium intracellulaire sur des cellules glomérulées. Nous avons aussi vérifié l'effet de plusieurs agents qui peuvent imiter l'action des seconds messagers, ainsi que des activateurs ou bloqueurs de canaux calciques. Les expériences qui ont été réalisées ont permis de comparer l'effet de chaque stimulus sur la  $[Ca^{2+}]_i$  et d'émettre une hypothèse sur le mécanisme d'action de l'ACTH.

Le second but de ce projet a été d'éclaircir la controverse qui règne au sujet de la structure-activité de l'ACTH. Dans notre étude, nous avons examiné l'effet de deux analogues de l'ACTH, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub>, sur la production d'AMPC et la sécrétion d'aldostérone. Les résultats de ces expériences sont assez concluants, quant à savoir si l'un de ces analogues utilise l'un ou l'autre des seconds messagers.



## II. MATERIEL ET METHODES.

### 1. Modèle biologique:

#### 1.1. Animaux

Les animaux utilisés ont été des rats femelles noir et blanc, de souche Long Evans. Elles provenaient de notre élevage local (CHUS). Lors de l'utilisation, les animaux étaient âgés d'environ douze semaines et pesaient 230 à 250 g. Ils étaient normalement logés par groupe de 6 ou 8 dans des cages, qui étaient placés dans une animalerie dont la température est de 24°C. Leur nourriture se composait de "Purina Laboratory Chow" et d'eau à volonté. Les surrénales de boeuf provenaient de l'abattoir local (Abattoir de Bromptonville).

#### 1.2. Cultures cellulaires.

##### 1.2.1. Préparation des cultures.

##### 1.2.1.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des glandes.

Les animaux (rats) sont sacrifiés par décapitation. Immédiatement après la mort, l'animal est placé sur le dos. On pratique une incision de la peau et des plans musculaires

de la partie médiane du corps afin de prélever les surrénales droite et gauche. Celles-ci sont placées dans une boîte de Pétri contenant du liquide physiologique et dégraissées à l'aide d'un scalpel (lame #10). Pour le boeuf, immédiatement après le prélèvement des glandes, celles-ci sont déposées dans un sac et mises sur la glace.

#### 1.2.1.2. Dissection des zones du cortex surrénalien.

Immédiatement après que les glandes soient dégraissées, on isole la portion capsulaire de la surrénale, c'est-à-dire la capsule conjonctive et la zone glomérulée. La technique utilisée est une modification de celle de GIROUD et coll. (1956) et de TAIT et coll. (1974). Les glandes sont posées sur une boîte de Pétri recouverte d'un papier filtre imbibé de milieu physiologique (MEM + 2% pénicilline et streptomycine). On pratique une légère incision pour percer la capsule conjonctive. La portion capsulaire est isolée à l'aide d'un scalpel et d'une fine paire de forceps. On soulève délicatement la portion capsulaire avec les forceps et l'on retire la portion interne avec le dos de la lame de scalpel en la roulant doucement. Les portions capsulaires sont déposées dans un milieu physiologique.

Après le dégraissage des glandes de boeuf, celles-ci sont découpées en petites sections et déposées dans un tampon HBS-glucose 1%. A l'aide d'une lame et d'un appareil en plexiglas,

qui compresse la pièce de tissu, on prélève une mince couche (0.5 mm) correspondant à la partie externe de la glande, ce qui représente la capsule conjonctive et la zone glomérulée. Les couches de tissu sont découpées en petits fragments de 1 mm<sup>2</sup>. Ces portions sont conservées dans du tampon HBS sur la glace.

#### 1.2.1.3. Isolement des cellules de la zone glomérulée.

La technique utilisée est une modification de celle qu'emploient BING et SCHULSTER (1977) et DOUGLAS et coll. (1978). Toutes les opérations, du sacrifice des animaux jusqu'à la mise en culture, se font dans des conditions stériles, dans une chambre de culture et sous hotte à flux laminaire. Les portions capsulaires (rats) sont incubées pendant 30 min dans du milieu physiologique contenant de la collagénase (2 mg/ml, 4 portions capsulaires/ml) et de la DNase (25µg/ml). L'incubation se fait dans un tube cône de 50 ml, dans un incubateur, sous une atmosphère contrôlée de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>, à la température de 37°C, tout en laissant le bouchon à peine fermé. Ce tube est agité doucement toutes les 5 min. Après l'incubation, le tissu est dispersé à l'aide d'une pipette de 10 ml. Après 20 à 30 aspirations, on remet à l'incubateur pour 5 min. Après cette incubation, on redisperse le tissu à 10 reprises. Cette suspension est filtrée dans un autre tube à travers un filtre de nylon



(450 $\mu$ m) qui retient les débris de tissu conjonctif. Le filtrat est centrifugé à 100 X g pendant 10 min. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu OPTIMEM + 2% FSC, dans un volume correspondant à la concentration cellulaire désirée pour les expériences.

La technique utilisée pour l'isolement de cellules glomérulées de boeuf est une modification de celle employée par De LEAN et coll. (1984). Les fragments tissulaires sont incubés pendant 30 min dans un milieu physiologique contenant de la collagénase (2mg/ml) et de la DNase (0.2 mg/ml). L'incubation se fait dans un tube conique de 50 ml dans un incubateur, sous atmosphère contrôlée de 95 % O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>, à une température de 37°C. Les tubes sont agités toutes les 5 min. Après l'incubation, les fragments sont dispersés mécaniquement à l'aide d'une pipette de 10 ml à embouchure large, 30 à 40 aspirations. On laisse déposer les fragments et on jette le surnageant. Le tissu de la surrénale de boeuf étant beaucoup plus fibreux que celui du rat, il est nécessaire de digérer les pièces de tissus à plusieurs reprises. On ajoute du milieu frais contenant de la collagénase et de la DNase. Après l'incubation de 20 à 30 min à 37°C, les cellules sont dispersées (30-40 aspirations). Après que les fragments sont déposés, le surnageant est filtré à travers un filtre de nylon (450 $\mu$ m) et le filtrat est centrifugé à 100 X g pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans 5 ml de milieu physiologique et mis sur la glace. Ces



opérations sont répétées 3 fois, pour un nombre final de cinq incubations. Après toutes ces opérations, les trois dernières fractions de 5 ml sont réunies et l'on complète à 50 ml avec le milieu physiologique. La fraction de 50 ml est centrifugée à 100 X g pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans le volume correspondant à la concentration cellulaire désirée dans du milieu DMEM + 10% FSC.

#### 1.2.2. Culture cellulaire (Pétri).

Une suspension cellulaire est préparée selon la technique décrite au chapitre II, paragraphe 1.2.1.3. Après la centrifugation des cellules, celles-ci sont resuspendues dans un milieu OPTIMEM contenant 2% de sérum foetal de boeuf, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine. Les cellules sont réparties dans des boîtes de Pétri ou des plaques à puits multiples contenant 2 ou 1 ml de milieu de culture, respectivement. Chaque boîte contient approximativement  $1 \times 10^5$  ou  $3 \times 10^5$  cellules lorsque l'on utilise des glomérulées de rat ou de boeuf, respectivement. Le milieu est renouvelé après 24 heures. Les cellules sont utilisées au troisième jour de culture.

### 1.2.3. Culture cellulaire sur lamelle de verre.

Pour les études de microspectrofluorométrie et d'imagerie, on doit cultiver les cellules sur des lamelles de verre. Celles-ci sont trempées dans de l'éthanol absolue et passées à la flamme, afin de les stériliser. Elles sont déposées dans des boîtes de Pétri de 3.5 cm. On dépose 2 ml d'une solution de poly-L-lysine 0.01% (stérile) dans chaque boîte, et on incube environ 18 heures. Après incubation, trois lavages avec de l'eau stérile sont effectués, puis les lamelles sont mises à sécher. Les cellules sont réparties sur les lamelles à une concentration d'environ  $5 \times 10^4$  cellules/ml, que ce soit pour les glomérulées de rat ou de boeuf.

## 2. Substances et solutions utilisées.

### 2.1. Substances et hormones utilisées.

L'ACTH utilisée est un dérivé synthétique de l'ACTH. L'ACTH<sub>1-24</sub> connu sous le nom commercial de Cortrosyn provient de chez Organon Canada Ltd., Ontario.

Les fragments de l'ACTH, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub>, proviennent de chez Bachem Inc., CA.

La (val)<sup>5</sup>-angiotensine II provient de chez Peninsula Laboratories, San Carlos, Californie.

La collagénase est obtenue de Gibco, Ontario. La déoxyribonucléase I, la trypsine, la bacitracine, le 8-bromo-AMPC et la w-conotoxine sont fournies par Sigma Chemical Company, St-Louis (MO), USA.

Les milieux de culture OPTIMEM, DMEM et MEM, les solutions de pénicilline, streptomycine et la glutamine ainsi que le sérum de veau foetal proviennent de chez Gibco, Ontario.

L'indicateur fluorescent FURA 2/AM et l'ionomycine sont fournis par Calbiochem, San Diego, Californie.

## 2.2. Solutions

### 2.2.1. Milieux de culture.

Les milieux de culture utilisés lors de ces études sont l'OPTIMEM et le DMEM. Lors de son utilisation, l'OPTIMEM est complémenté avec 2% de sérum de veau foetal et 100 U/ml de pénicilline et de streptomycine. Le DMEM, quant à lui, est complémenté avec 10% de FSC, 100 U/ml de pénicilline et de streptomycine et de glutamine. La concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  est la suivante (en mM):  $\text{CaCl}_2$ ; 1.8, KCl; 5.36, NaCl; 110. La composition en acides aminés et vitamines des milieux est donnée en annexe.

## 2.2.2. Solutions utilisées lors des mesures de calcium intracellulaire.

### 2.2.2.1. Milieu de charge.

La composition du milieu de charge des cellules est la suivante (100 ml):

- 10 ml de MEM
- 100 U/ml pénicilline
- 100 U/ml streptomycine
- 3 ml de  $\text{NaHCO}_3$  7.5%
- HEPES 20mM
- glutamine 2 mM

### 2.2.2.2. Milieu d'hydrolyse.

Le milieu d'hydrolyse du FURA 2 utilisé est un tampon HBS modifié dont la composition est la suivante (mM): NaCl; 130, KCl; 3.5,  $\text{CaCl}_2$ ; 0.1,  $\text{MgCl}_2$ ; 0.98, HEPES; 20,  $\text{NaHCO}_3$ ; 5, EGTA; 0.1 et 1% de glucose. L'osmolalité du milieu est de 296 mOs/kg et le pH 7.4.

### 2.2.2.3. Milieus de perfusion.

Les deux milieux de perfusion utilisés sont des tampons HBS avec deux concentrations différentes de calcium. La composition du premier milieu avec une concentration



physiologique de calcium de 1.1 mM est la suivante (mM): NaCl; 130, KCl; 3.5,  $\text{CaCl}_2$ ; 1.1,  $\text{MgCl}_2$ ; 0.98, HEPES; 20,  $\text{NaHCO}_3$ ; 5, EGTA; 0.1 et 1% de glucose. L'osmolalité est de 296 mOs/kg et le pH 7.4. La composition du second milieu est la même que la précédente, excepté que la concentration finale de calcium,  $10^{-7}$  M, a été obtenue en ajoutant de l'EGTA 0.5 mM au milieu contenant initialement du  $\text{Ca}^{2+}$  0.28 mM. Ces concentrations ont été déterminées par un programme sur ordinateur conçu par FABIATO (1989).

#### 2.2.3. Solutions utilisées lors des dosages radioimmunologiques.

La solution utilisée lors du dosage d'aldostérone est un tampon phosphate avec la composition suivante (mM):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 50, NaCl; 150,  $\text{NaN}_3$ ; 0.1% et BSA; 0.5%, pH 7.4.

La solution utilisée lors du dosage de la corticostérone est une solution saline à 0.9%.

#### 2.2.4. Solutions utilisées lors des mesures d'AMP cyclique.

##### 2.2.4.1. Milieu d'incubation avec l'adénine tritiée.

Le milieu d'incubation utilisé dans les mesures d'AMPc cyclique est le milieu de culture complet auquel on a rajouté de l'adénine tritiée ( $2\mu\text{Ci/ml}$ ).

#### 2.2.4.2. Milieu de stimulation.

Le milieu de stimulation est un tampon HBS (voir chapitre II, paragraphe 2.2.2.3.).

### 3. Mesures de l'activité biologique.

#### 3.1. Stimulation hormonale sur les cultures cellulaires.

Avant la stimulation hormonale, le milieu de culture est aspiré de chaque boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont lavées deux fois avec une solution de lavage (tampon HBS ne contenant pas de BSA). Après cela, 900 $\mu$ l de tampon HBS contenant de la BSA 0.5% et de la bacitracine (0.01 mg/ml) sont ajoutés à chaque boîte. Par la suite, 100 $\mu$ l de la solution contenant la stimulation hormonale (10X) sont ajoutés à chaque boîte. Les boîtes sont alors incubées pendant 2 heures, sous atmosphère contrôlée (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>), à 37°C. Après l'incubation, le milieu est aspiré et conservé au congélateur jusqu'au dosage radioimmunologique. Pour effectuer le comptage des cellules, celles-ci sont détachées par incubation de 10 à 15 min avec une solution de trypsine (0.25%) à 37°C. Celle-ci est neutralisée avec le tampon HBS. On compte les cellules à l'aide d'un hémacymètre.

### 3.2. Dosage de la corticostérone.

La corticostérone est mesurée par la technique utilisant la protéine de liaison nommée CBG (Corticosteroid binding globulin) en guise d'anticorps. Ce dosage se fait selon la technique de LECLERQ et coll. (1969), qui est une modification de la méthode mise au point par MURPHY (1967).

Tout d'abord, on prépare une courbe de référence de corticostérone en utilisant 10 concentrations s'échelonnant de 0 à 200 ng. Celle-ci est préparée à partir d'une solution standard de corticostérone diluée dans de l'éthanol 95%. Par la suite, l'éthanol est évaporée dans un bain à 37°C, et la corticostérone est resuspendue dans 200  $\mu$ l de NaCl 0.9%. Le dosage de la corticostérone s'effectue avec un volume de 200  $\mu$ l du milieu qui est retiré de chaque boîte de Pétri. Ensuite on rajoute 1 ml de "pool" à chaque tube. Ce "pool" est constitué de: 3 ml de plasma humain (contenant la CBG), 100 ml de NaCl 0.9%, et environ 2  $\mu$ l de corticostérone tritiée (20000 cpm). On incube pendant 10 min dans un bain à 37°C, et pendant 30 min à 4°C. Après l'incubation, on sépare l'hormone liée à la CBG de l'hormone libre à l'aide de 500  $\mu$ l d'un mélange charbon-dextran (2g de charbon Norit A, 200 mg de Dextran T70 dans 400 ml de NaCl 0.9%). Après cela, on centrifuge tous les tubes pendant 10 min à 3500 rpm à 4°C. On prélève le surnageant, dans lequel se trouve le complexe hormone-CBG, que l'on décante dans un flacon à scintillation

contenant 8 ml de liquide à scintillation (Readygel). Chaque flacon est compté dans un compteur Béta (Hewlett-Packard).

### 3.3. Dosage de l'aldostérone.

Pour doser l'aldostérone, on utilise un anticorps spécifique à l'aldostérone (Anti-aldostérone-3-BSA serum, ICN Immunobiologicals). On prépare une courbe de référence d'aldostérone dont les concentrations varient entre 0 et 20 ng, à partir d'une solution standard d'aldostérone diluée dans de l'éthanol. On prélève 400  $\mu$ l du surnageant que l'on veut doser. Par la suite, on ajoute 200  $\mu$ l de la solution d'anti-aldostérone. L'anti-aldostérone est reconstitué avec 5 ml de tampon phosphate, que l'on redilue avec 10 ml de tampon au moment de l'utilisation. On mélange tous les tubes et on laisse incuber pendant 30 min sur la glace. Après l'incubation, on rajoute 100  $\mu$ l de la solution d'aldostérone tritiée (2  $\mu$ l d'aldostérone tritiée/10 ml de tampon = 20000 cpm). Les tubes sont agités au vortex et incubés toute la nuit à 4°C. Le lendemain, on effectue un arrêt au charbon-dextran (250  $\mu$ l/tube). Les tubes sont agités au vortex et centrifugés pendant 10 min à 2500 rpm, à une température de 4°C. Après cela, le surnageant est décanté dans un flacon à scintillation, auquel on rajoute 8 ml de liquide à scintillation. Chaque tube est compté pendant 1 min dans un compteur Béta.



#### 4. Mesures d'AMP cyclique intracellulaire.

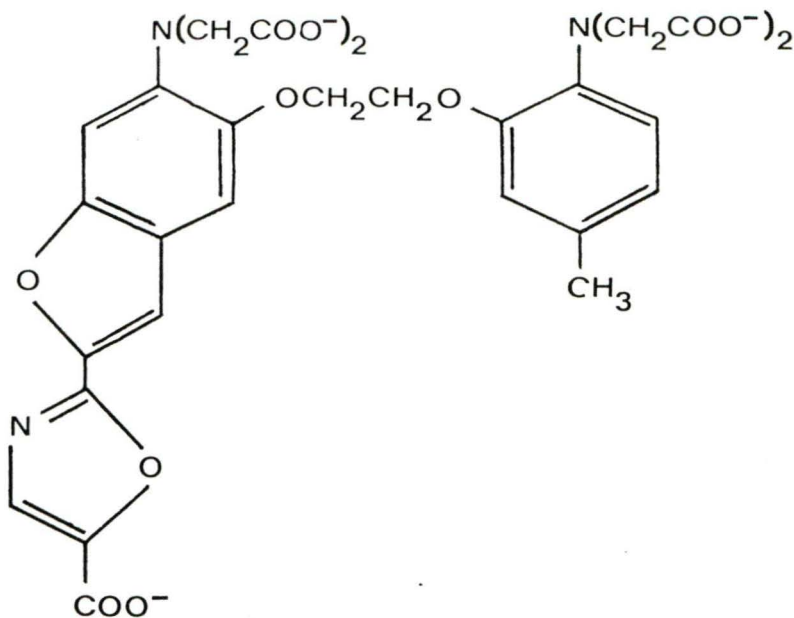
La méthode utilisée pour doser l'AMPc est une modification de celle de WEISS et coll. (1985). Le jour de l'expérience, on remplace le milieu de culture de chaque boîte de Pétri, par un milieu de culture contenant de l'adénine tritiée ( $2\mu\text{Ci/ml}$ ). On laisse incuber pendant une heure. Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon HBS-glucose, pour chasser l'adénine non incorporée aux cellules, puis incubées 15 min à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous atmosphère contrôlée, dans  $900\mu\text{l}$  de tampon HBS contenant de l'IBMX  $1\text{ mM}$ , qui est un inhibiteur des phosphodiésterases, et permet de mesurer l'AMPc accumulé pendant l'incubation avec les stimuli. A la fin de l'incubation,  $100\mu\text{l}$  de stimulations hormonales sont ajoutées à chaque boîte. Les cellules sont incubées pendant 15 min, période pendant laquelle l'accumulation de l'AMPc est linéaire, sous atmosphère contrôlée et à une température de  $37^{\circ}\text{C}$ . A la fin de l'incubation, le milieu est aspiré et remplacé par  $1\text{ ml}$  d'acide trichloroacétique  $5\%$ . Les cellules lysent et libèrent l'AMPc. Les cellules sont grattées et transférées dans des tubes de polystyrène. Dans chaque tube  $100\mu\text{l}$  d'une solution AMPc/ATP ( $0.1\text{ M}$ ) sont ajoutés comme entraîneur. Les tubes sont agités au vortex et centrifugés pendant 15 min à  $3000\text{ rpm}$  à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants contenant l'ATP et l'AMPc sont déposés sur des colonnes DOWEX AG50WX8 (Bio-Rad, Richmond, CA).

Auparavant, les colonnes DOWEX ont été régénérées avec une solution de HCl 2N, et avant l'utilisation, la résine est éluée avec 6 ml d'eau. Après avoir déposé les surnageants, les colonnes sont éluées avec 3 ml de H<sub>2</sub>O que l'on recueille dans des flacons à scintillation. Ceci nous permet de recueillir l'ATP tritié. Après cela, on superpose les colonnes de DOWEX sur des colonnes d'alumine Woelm Pharma: 02087 (Bio-Rad, Richmond, CA). Suite à cela, on fait éluer 6 ml d'eau que l'on jette. Les colonnes de DOWEX sont enlevées. Sur chaque colonne d'alumine, on lave avec 1 ml d'une solution d'imidazole 0.1 M, pH 7.4. Après cela, on ajoute 6 ml de cette même solution d'imidazole que l'on recueille dans des flacons à scintillation. Ceci nous permet de recueillir l'AMPc tritiée. On rajoute 8 ml de liquide à scintillation dans chaque flacon que l'on fait compter dans un compteur à scintillation. Le rapport AMPc tritié/ATP tritié X 100, donne le pourcentage de conversion ATP→AMPc.

## 5. Mesures de calcium intracellulaire par fluorescence.

### 5.1. L'indicateur fluorescent FURA 2.

Le FURA 2 est un dérivé des chélateurs de calcium, EGTA et BAPTA. La structure de cet indicateur est la suivante:



Le FURA 2 ne peut pénétrer à l'intérieur des cellules sous sa forme acide. On utilise le FURA 2 AM, qui est son dérivé acétométhyl ester, ce qui le rend liposoluble. Celui-ci diffuse à travers la membrane plasmique dans le cytoplasme où des estérases endogènes hydrolysent le groupement ester et ainsi le FURA 2 ne peut ressortir de la cellule.

Le FURA 2 possède deux longueurs d'ondes d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission. La longueur d'onde d'excitation pour le FURA 2 libre est de 380 nm et pour le FURA 2 lié au calcium, 340 nm. Les deux formes, libre et liée, émettent à 510 nm. Cela nous permet de faire un rapport de la fluorescence émise quand on excite le FURA 2 à 340 nm et 380 nm. Ce rapport de  $F_{340}/F_{380}$  représente la quantité de calcium cytosolique libre dans la cellule.

### 5.2. Chargement des cellules avec le FURA 2 AM.

Après le 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> jour de culture, les milieux de culture sont aspirés et remplacés par 1 ml du milieu de charge. Le FURA 2 AM est ajouté à chaque boîte de Pétri. Celui-ci est préparé à partir d'une solution stock, que l'on resuspend dans du diméthyl sulfoxide (DMSO). La concentration finale de FURA 2 est de 2  $\mu$ M. Le temps de charge est de 30 min. Après la charge, le milieu est enlevé et remplacé par 1 ml de milieu HBS frais (milieu d'hydrolyse). Une incubation de 30 min est effectuée pour permettre aux estérases d'hydrolyser le FURA 2 AM. Ces temps de charge et d'hydrolyse ont été déterminés avec plusieurs essais après lesquels on a mesuré l'intensité de fluorescence des cellules.

### 5.3. Mesures de calcium intracellulaire par microspectrofluorométrie.

La fluorescence des cellules chargées en FURA 2 est mesurée à 37°C avec l'aide d'un microspectrofluorimètre. La lamelle de verre est montée dans une chambre à perfusion. Cette chambre est fixée sur la platine du microscope inversé (NIKON Canada Instruments, Ontario). Le milieu de perfusion est continuellement perfusé dans la chambre à l'aide d'une pompe péristaltique et gardé à 37°C. Les solutions expérimentales sont appliquées au voisinage de la cellule à



l'aide d'une micropipette installée sur un micromanipulateur, et sont appliquées par gravité à un débit de 1 ml/min (voir le schéma en annexe). Le microscope est couplé à un système Fluoroplex III (Tracor Northern, Middleton, WI). La source lumineuse utilisée est une lampe au xénon 150 W et les deux longueurs d'ondes d'excitation sont fournies par deux monochromateurs. Une alternance rapide entre les deux longueurs d'ondes d'excitation est effectuée par une roue rotative contrôlée par l'ordinateur. La lumière est acheminée à la section épi-illumination du microscope par un réseau de fibres optiques. Un miroir dichroïque DM400 de Nikon et un filtre barrière BA510/20 (NIKON) complète le système de fluorescence. Lors des mesures de  $[Ca^{2+}]_i$ , un objectif CF Phase Fluorite DL40X/1.3 de Nikon est utilisé. La lumière émise est mesurée au moyen d'un photomultiplicateur (voir le schéma en annexe).

La fluorescence de fond (background) est prise aux deux longueurs d'ondes dans un champ sans cellule et soustraite de chaque mesure. On utilise des disques de différentes tailles pour isoler une seule cellule dans le champ. Les vitesses d'acquisition varient de 2 à 4 mesures par seconde.

#### 5.4. Mesures de calcium intracellulaire avec la technique d'imagerie.

Pour la technique d'imagerie, on utilise une caméra SIT (model 66, DAGE-MTI Inc., Michigan city, IN) pour recueillir les images des cellules. Un logiciel d'analyse d'images (TN8502, Tracor Northern) a été utilisé pour le contrôle d'acquisition des données et l'analyse des images (voir le schéma en annexe). La sortie vidéo a été convertie en mode digital (résolution de 512 X 480) et les images ont été emmagasinées dans la mémoire de l'ordinateur avec une résolution de 256 X 256 pixels avec une profondeur de 16 bits. Les images de fond (moyenne de 33 images) ont été prises aux deux longueurs d'ondes avant chaque expérience. Celles-ci ont été soustraites de chaque image successive. Les images "rapports" (340/380) ont été calculées par la suite avec les images corrigées. Un masque de recouvrement binaire de la cellule a été appliqué aux images rapports pour permettre de garder la cellule seule dans le champ. Le masque de recouvrement est construit automatiquement en prenant les pixels au-dessus d'un niveau d'intensité seuil ou encore selon l'utilisateur de telle manière que l'image de la cellule à 340 ou 380 nm soit bien définie. Le masque est ensuite appliqué à chaque image rapport. S'il y a un changement dans la forme ou la position de la cellule, le masque est refait. Les images ont été filtrées et

pseudocolorées en définissant une palette de couleurs. La couleur bleue reflète les faibles concentrations de calcium, et la couleur rouge, les intensités les plus fortes.

#### 5.5. Calibration de la fluorescence.

La calibration du FURA 2 à l'intérieur de la cellule a été effectuée à la fin de chaque expérience. La concentration de calcium intracellulaire a été calculée selon l'équation de GRYNKIEWICZ et coll. (1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}/R_{max} - R) * (F_o/F_s)$$

La constante de dissociation à l'équilibre ( $K_d$ ) pour le FURA 2 est de 224 nM telle que déterminée par GRYNKIEWICZ et coll. (1985).  $R_{max}$  est le rapport de l'intensité lumineuse émise aux longueurs d'ondes d'excitation 340 et 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ), lorsque le FURA 2 est saturé en calcium.  $R_{min}$  est le rapport de l'intensité lumineuse émise lorsque le FURA 2 se trouve dans des conditions minimales de  $[Ca^{2+}]_i$ . Le rapport  $F_o/F_s$  est obtenu à la longueur d'onde d'excitation 380 nm, à de faibles et fortes concentrations de  $Ca^{2+}$ , et il a une valeur de 11.5.  $R_{max}$  a été obtenu en ajoutant 10  $\mu$ M d'ionomycine dans la chambre de perfusion. Par la suite, on ajoute 20 mM d'EGTA pour déterminer  $R_{min}$ . Les valeurs d'autofluorescence ont été mesurées dans des cellules non-chargées à chaque longueur

d'onde. Cette valeur est d'environ 3% de la fluorescence dans des cellules chargées. L'autofluorescence a été soustraite de chaque donnée avant d'effectuer le rapport.

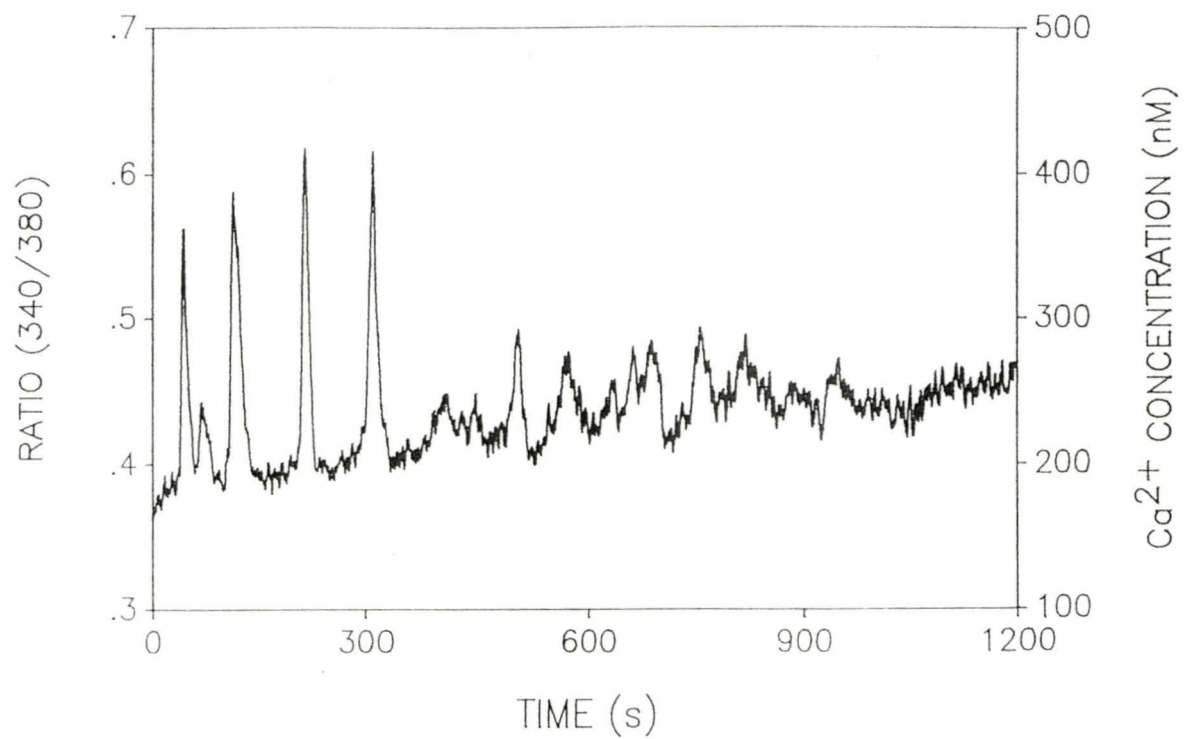


### III. RESULTATS.

#### 1. Niveaux de base de la concentration du calcium intracellulaire.

La concentration de calcium cytosolique ( $[Ca^{2+}]_i$ ) a été déterminée par des mesures de fluorescence dans des cellules glomérulées individuelles de surrénales de boeuf et de rat. Le niveau de  $[Ca^{2+}]_i$  basal est similaire dans les deux espèces animales. Chez le rat, la valeur moyenne est de  $134.1 \pm 9.9$  nM. Cette concentration est exprimée par la moyenne  $\pm$  l'écart-type à la moyenne ( $X \pm SEM$ ). La valeur trouvée est la moyenne de 9 expériences réalisées dans les mêmes conditions. Chez le boeuf, la valeur moyenne est de  $118.8 \pm 9.5$  nM ( $n=9$ ). Dans les cellules glomérulées de boeuf, des oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  sont quelquefois présentes. L'amplitude de ces oscillations varie d'une cellule à l'autre ou encore à l'intérieur de la même cellule. Ces oscillations basales ont été observées dans 30% des cellules glomérulées de boeuf. Par contre, ces oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été rarement observées chez les cellules glomérulées de rat (Fig.4).

Figure 4: Oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  dans une cellule glomérulée de boeuf: cette figure illustre la  $[Ca^{2+}]_i$  comme une fonction du rapport  $F_{340}/F_{380}$  sur la gauche et en concentration (nM) sur la droite. Ces oscillations ont pu être observées dans 30% des cellules glomérulées de boeuf mais non chez celles de rat.



## 2. Mesures de calcium intracellulaire par microspectrofluorométrie.

### 2.1. Effet de différentes hormones et ions sur la $[Ca^{2+}]_i$ sur des cellules glomérulées en culture.

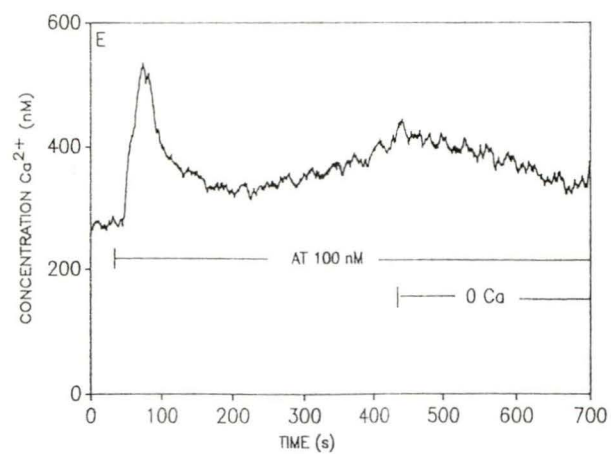
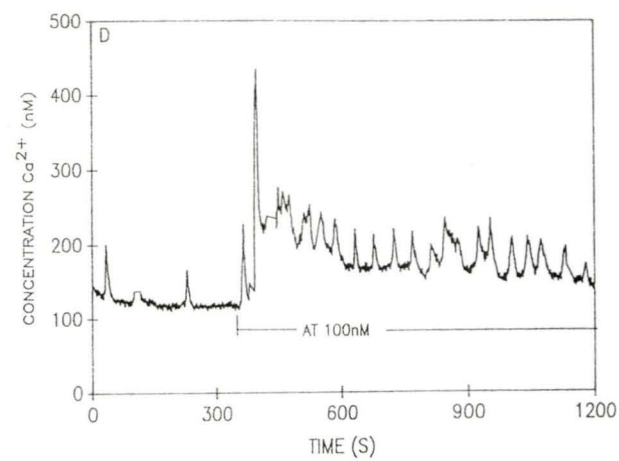
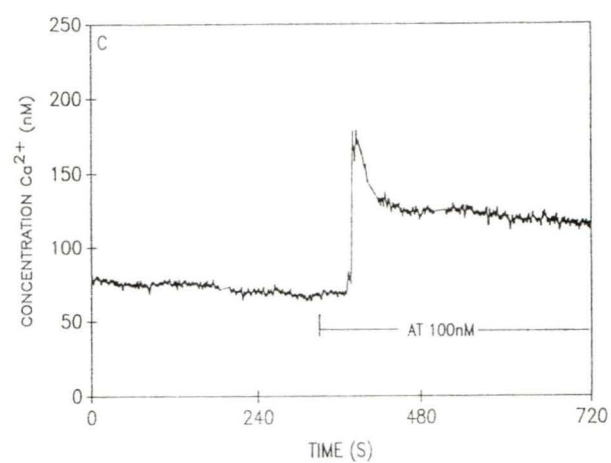
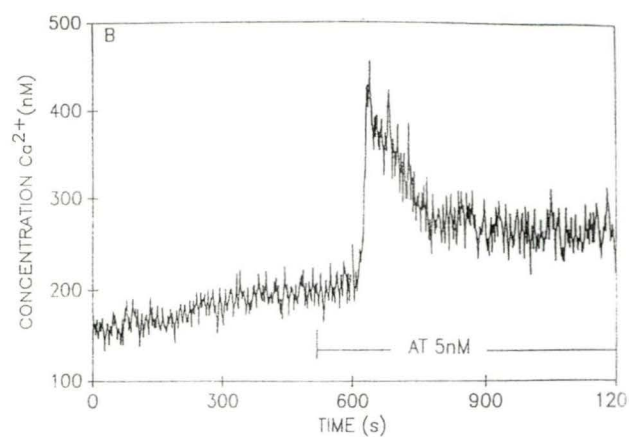
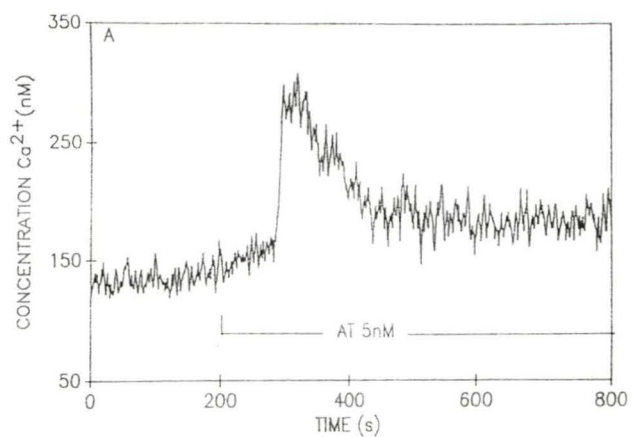
Dans cette première partie des résultats, nous avons comparé l'effet des principaux sécrétagogues de l'aldostérone (angiotensine II, ACTH et  $K^+$ ) sur la  $[Ca^{2+}]_i$  des cellules glomérulées de la surrénale.

#### 2.1.1. Effet de l'angiotensine II.

Lorsque des cellules glomérulées sont stimulées par de l'angiotensine II, cette dernière induit une augmentation rapide, mais transitoire, de la concentration de calcium intracellulaire, suivi d'un plateau soutenu de  $[Ca^{2+}]_i$ , telle qu'illustrée dans les figures 5a, 5b, 5c et 5d. Les cellules glomérulées de boeuf stimulées avec une concentration d'angiotensine II de 5 nM, augmente leur  $[Ca^{2+}]_i$  de  $151.7 \pm 10.2$  à  $400.0 \pm 38.4$  nM au pic et à  $218.3 \pm 20.5$  nM durant la phase de plateau. Ces résultats sont la moyenne de trois expériences. Lors d'une stimulation avec de l'angiotensine II 100 nM, la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente de  $96.6 \pm 10.8$  nM à  $314.2 \pm 68.8$  nM au pic et à  $227.5 \pm 64.2$  durant la phase de plateau. Ces résultats sont la moyenne de six expériences. L'angiotensine



Figure 5: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'angiotensine II dans des cellules glomérulées de surrénale de boeuf (A-D) et de rat (E): les tracés A et B représentent l'effet de l'angiotensine II (5 nM) sur la  $[Ca^{2+}]_i$ . Dans les tracés D et E, on remarque l'effet de l'angiotensine II (100 nM) sur les changements de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Le tracé E représente l'effet de l'angiotensine II (100 nM) sur une cellule glomérulée de surrénale de rat.



II à des concentrations de 5 nM et 100 nM augmentent de 2.65 et 3.25 fois la  $[Ca^{2+}]_i$  par rapport au niveau de base. Dans la figure 5d, on remarque la présence d'oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'état de repos. L'application de l'angiotensine II induit une augmentation rapide et transitoire, suivie par une série d'oscillations avec une fréquence beaucoup plus grande que celles à l'état basal (0.026 Hz vs 0.013 Hz). Dans la figure 5e, on remarque l'effet de l'angiotensine II sur une cellule glomérulée de rat. Le profil de la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  est le même que chez une cellule glomérulée de boeuf.

#### 2.1.2. Effet du potassium.

L'application d'une solution de potassium (9 mM) sur une cellule glomérulée de boeuf induit une augmentation rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Lorsqu'on cesse l'application de la solution de  $K^+$ , on remarque une diminution immédiate de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig.6). Suite à des applications successives de  $K^+$ , on constate qu'il y a eu augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à chaque stimulation.

#### 2.1.3. Effet de l'ACTH.

L'application de différentes concentrations d'ACTH sur des cellules glomérulées montre que le profil de la réponse est complètement différent de celui observé avec

Figure 6: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induit par le potassium: ce tracé illustre l'effet de plusieurs applications successives de KCl (9 mM) sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans une cellule glomérulée de boeuf.



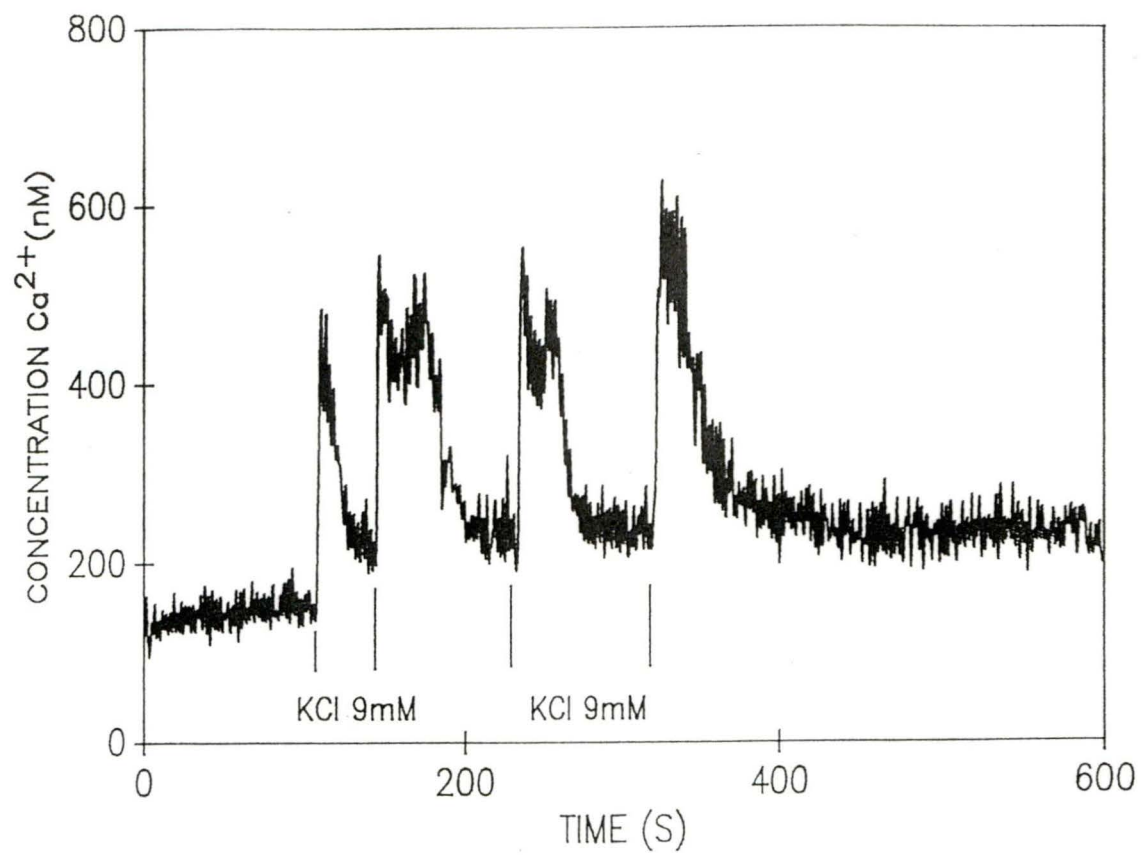
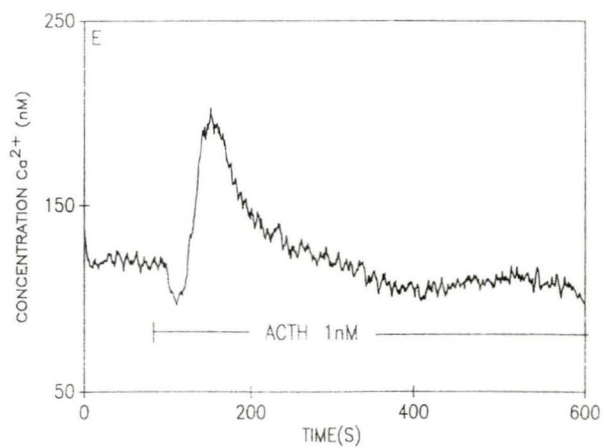
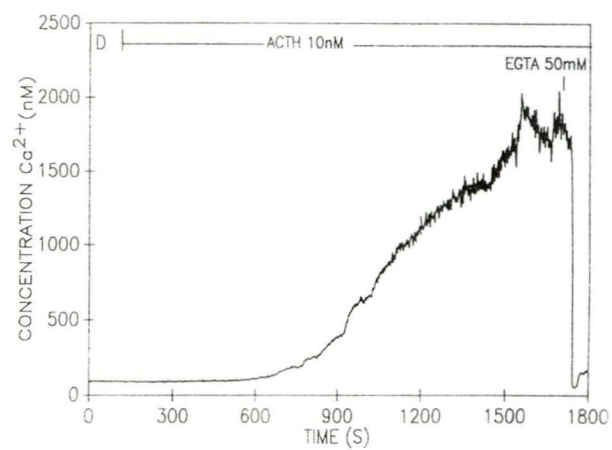
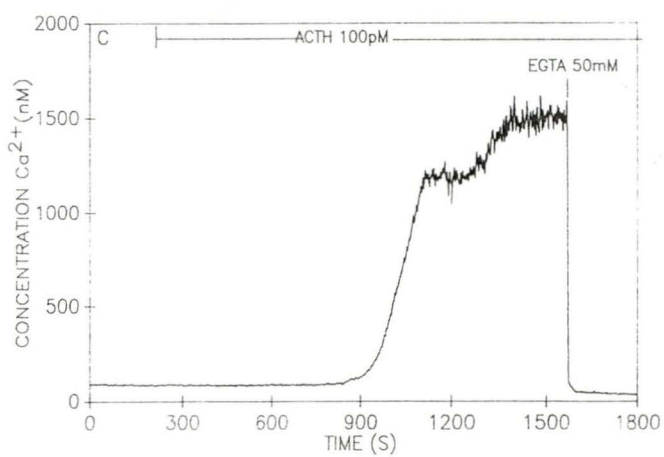
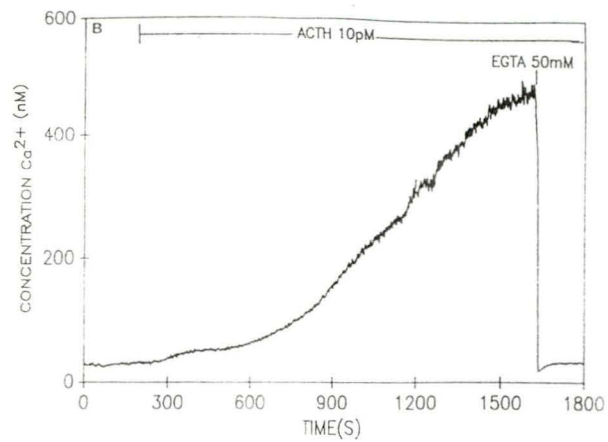
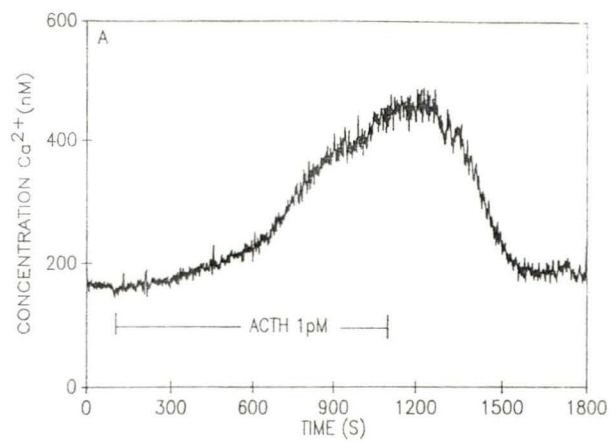


Figure 7: Effet de l'ACTH sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules glomérulées de surrénale de rat: les tracés A-D montrent les effets de l'ACTH à des concentrations de  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  M respectivement. Le tracé E illustre une réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  transitoire induite par l'ACTH ( $10^{-9}$ M).



l'angiotensine II. Les figures 7a à 7e illustrent les effets de l'ACTH sur des cellules glomérulées de rat. La réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  suite à une stimulation à l'ACTH apparaît très lentement. On observe une augmentation progressive, suivie d'un plateau qui se maintient tant et aussi longtemps que la cellule est sous stimulation. Cette  $[Ca^{2+}]_i$  chute rapidement et retourne au niveau de base lorsque l'on cesse d'appliquer l'ACTH (fig.7a), ou lorsque l'on ajoute de l'EGTA, un chélateur de calcium, tel qu'illustré dans les figures 7b, 7c et 7d. Il arrive quelquefois que l'ACTH provoque une augmentation rapide et transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$ , comme on peut le voir dans la figure 7e. Ce type de réponse ne se produit que très rarement (<10%).

## 2.2. Effet d'un milieu sans calcium sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'angiotensine II, l'ACTH, sur des cellules glomérulées en culture.

Les expériences décrites dans les lignes qui suivent ont pour but de déterminer l'importance du  $Ca^{2+}$  externe dans la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'angiotensine II et l'ACTH.

### 2.2.1. Stimulation par l'angiotensine II.

La figure 8 illustre le rôle du  $Ca^{2+}$  extracellulaire dans les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induit par l'angiotensine II dans



différentes cellules glomérulées de boeuf. Dans la figure 8a, l'addition de 100 nM d'angiotensine II induit une augmentation rapide et transitoire de  $[Ca^{2+}]_i$  suivi d'un plateau. Si le milieu de perfusion contenant le  $Ca^{2+}$  (1.1 mM) est changé pour un milieu de perfusion sans  $Ca^{2+}$  ( $10^{-7}M$ ), le plateau disparaît et la  $[Ca^{2+}]_i$  retourne au niveau de base, et cela même en présence d'angiotensine II. Dans la figure 8b, on note la présence d'oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'état basal. L'addition de 5 nM d'angiotensine II induit une augmentation de la fréquence de ces oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$ . En présence d'un milieu sans calcium, on remarque la diminution de la fréquence des oscillations jusqu'à leur disparition, et par la suite, la  $[Ca^{2+}]_i$  retourne à son niveau de base. Dans la figure 8c, la cellule a été stimulée par 100 nM d'angiotensine II, en présence d'un milieu sans calcium. L'angiotensine II a provoqué une augmentation rapide et transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$ , mais nous n'observons pas d'apparition de plateau.

#### 2.2.2. Stimulation par l'ACTH.

La figure 9 illustre le rôle du calcium externe dans la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH. Le profil des réponses de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les figures 9a, 9b est le même: une réponse lente à apparaître, la  $[Ca^{2+}]_i$  qui augmente progressivement jusqu'à un plateau. Lorsque l'on change le milieu de perfusion pour un milieu sans  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue

Figure 8: Rôle du calcium extracellulaire dans les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'angiotensine II dans des cellules glomérulées de surrénale de boeuf: Dans le tracé A, la cellule a été perfusée avec un milieu contenant 1.1 mM  $Ca^{2+}$ , l'addition d'angiotensine II (100 nM) a induit une augmentation immédiate de  $[Ca^{2+}]_i$  suivie d'un plateau soutenu. Lors de la perfusion avec un milieu sans calcium, la  $[Ca^{2+}]_i$  retourne au niveau de base. Dans le tracé B, l'angiotensine II (100 nM) a induit de rapides oscillations lesquelles ont cessé en absence de calcium. Dans le tracé C, la cellule a été perfusée avec un milieu sans calcium et stimulée avec l'angiotensine II (100 nM).

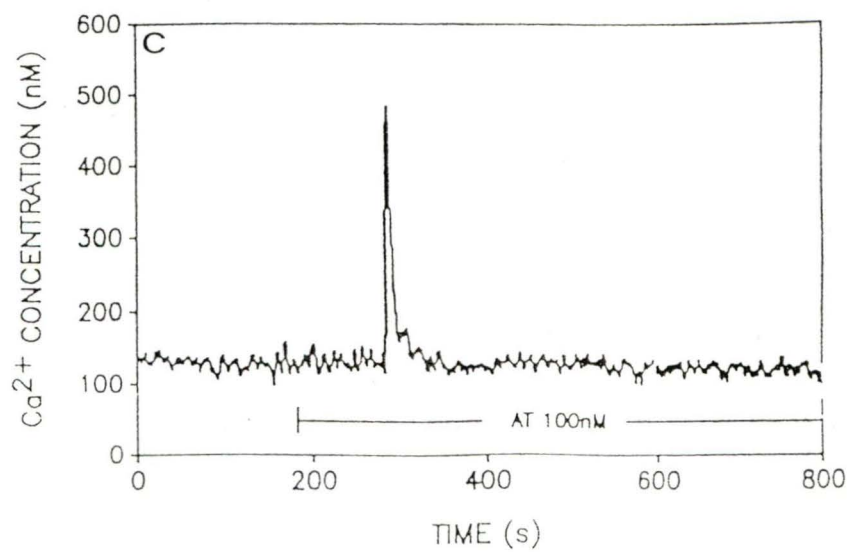
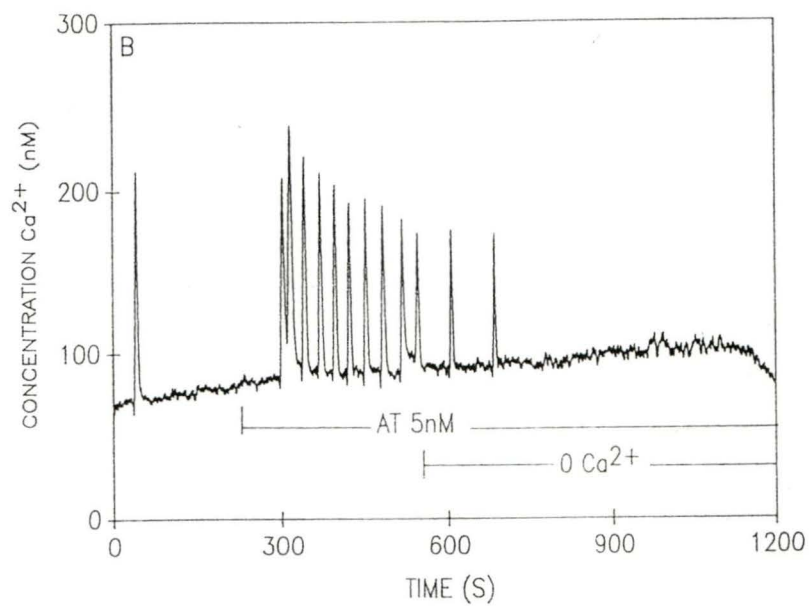
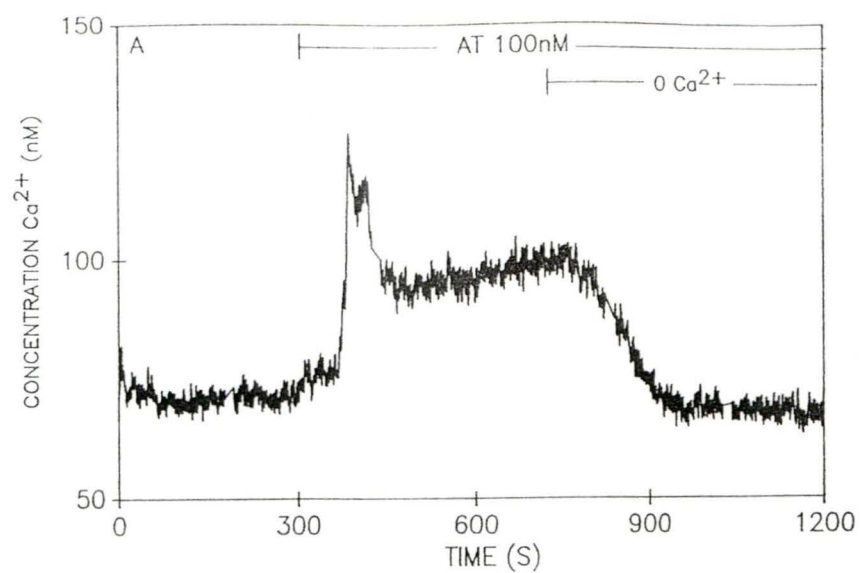
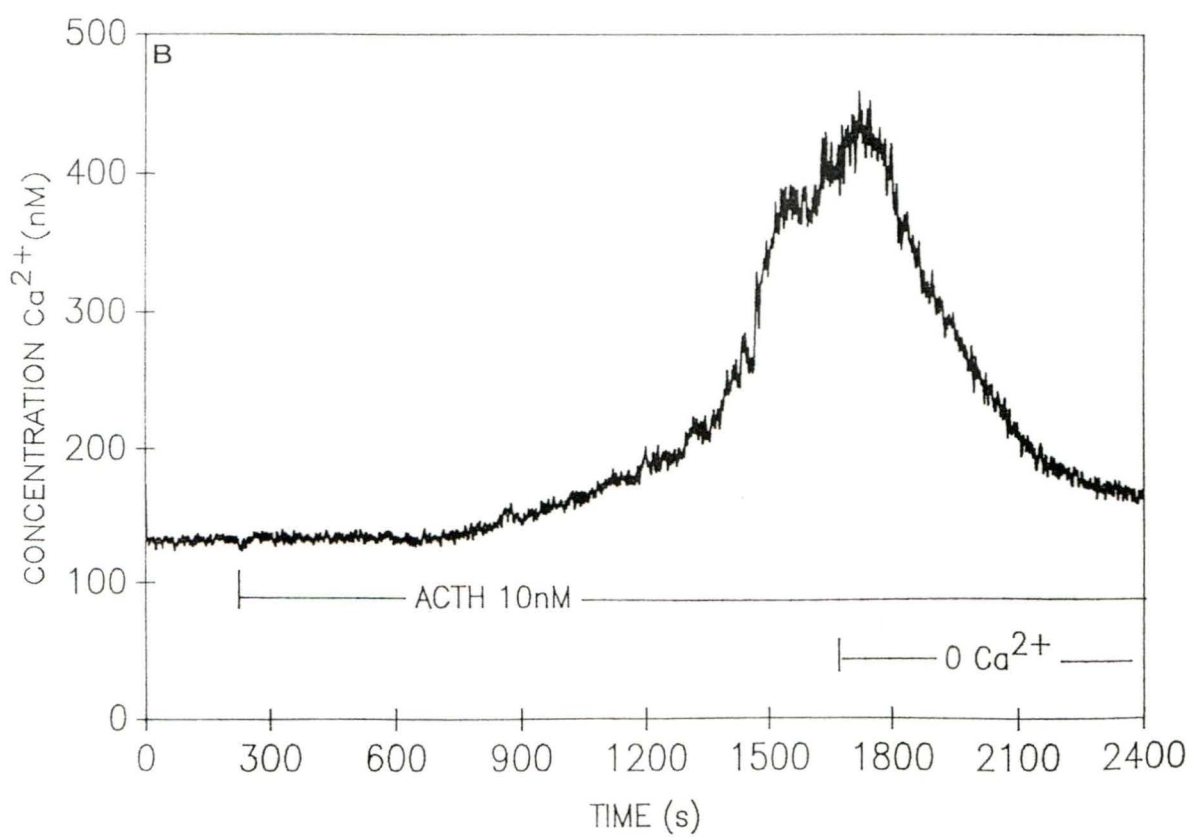
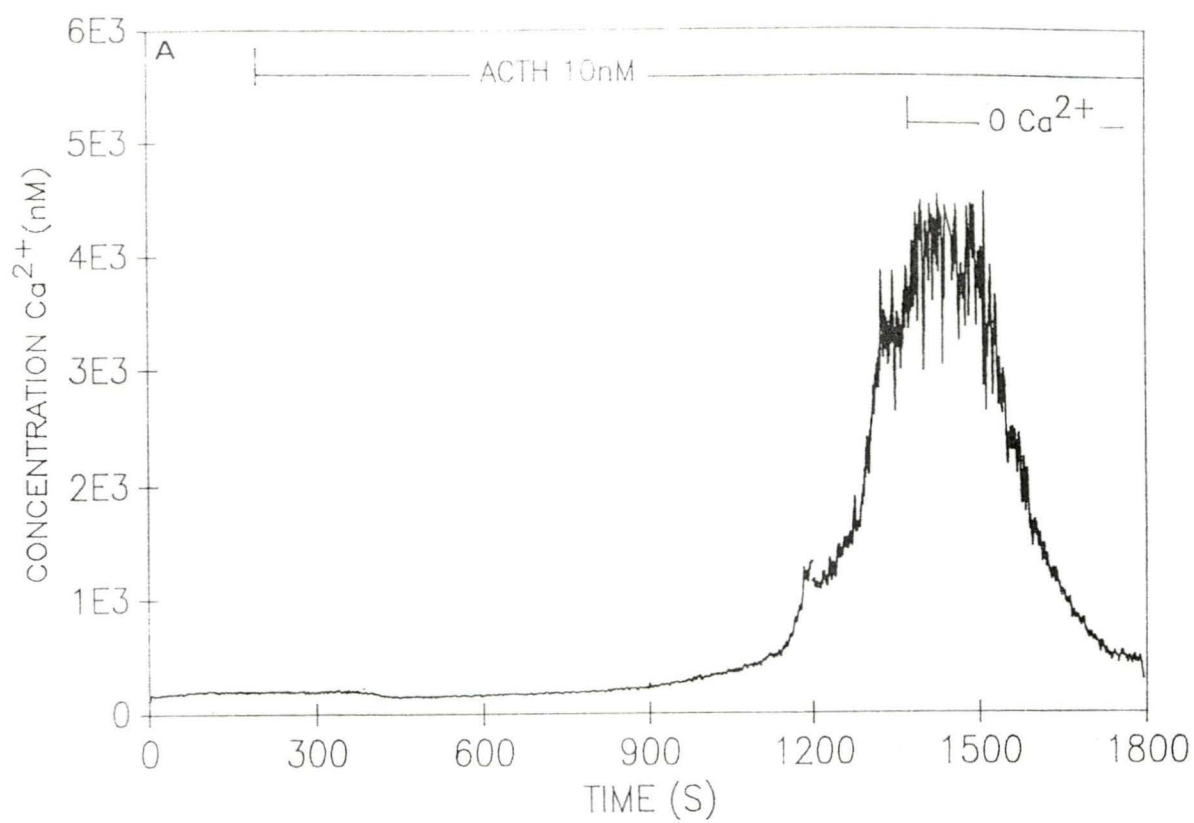


Figure 9: Rôle du calcium extracellulaire dans les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'ACTH dans des cellules glomérulées de surrenale de boeuf: les tracés A et B illustrent les effets d'un milieu sans calcium sur la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH (10 nM). On peut observer qu'en absence de calcium extracellulaire, la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue jusqu'aux valeurs de base. A noter que les tracés A et B représentent deux expériences identiques mais sur deux cellules différentes.





rapidement pour retourner au niveau de base, et cela même en présence continue d'ACTH.

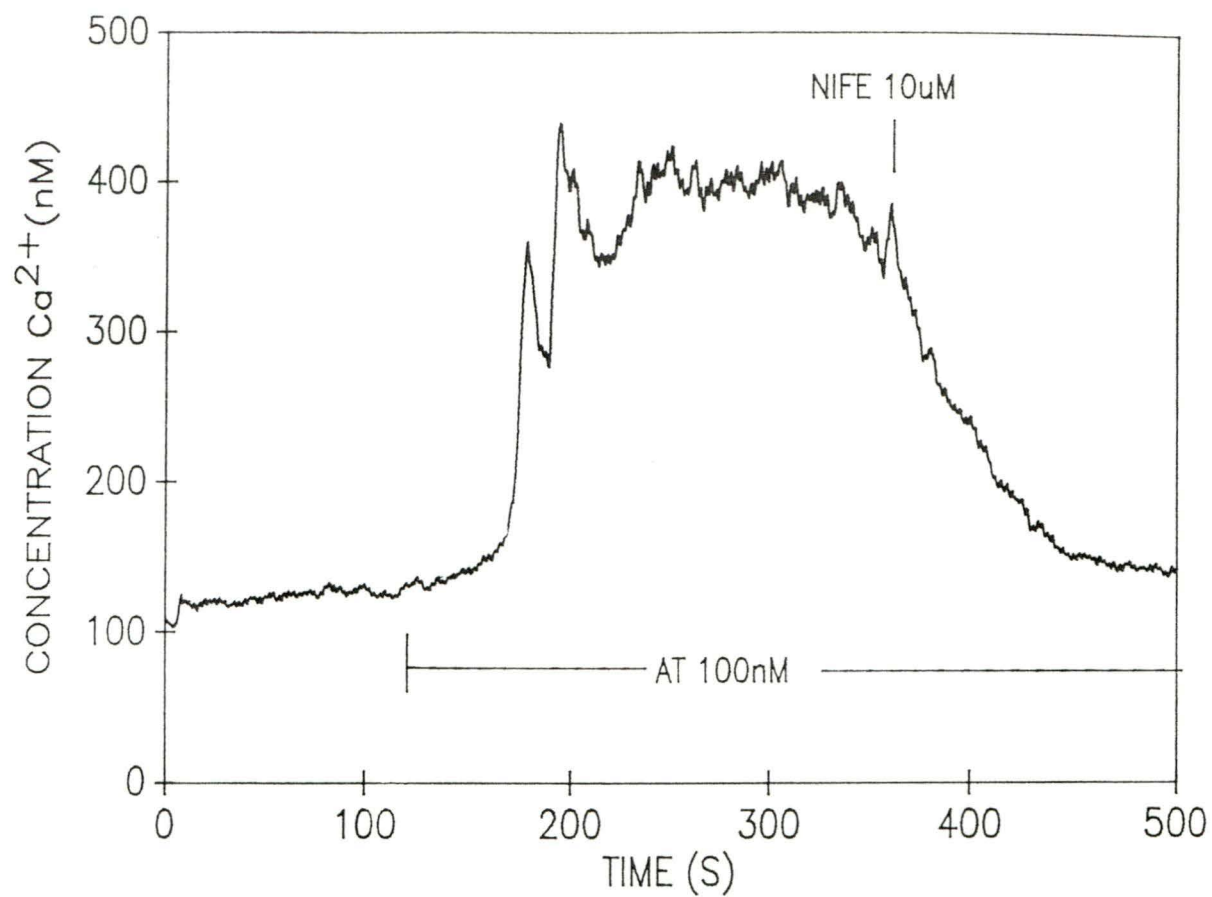
### 2.3. Effet de différentes dihydropyridines sur la réponse de $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'angiotensine II et l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.

Le but des expériences qui suivent est de déterminer si les canaux calciques dépendants du voltage (type L) sont impliqués dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , lors d'une stimulation avec l'angiotensine II ou l'ACTH. Pour cela nous avons utilisé des substances appelées dihydropyridines, qui sont connus pour être spécifiques aux canaux calciques de type L (HOSEY et LAZDUNSKI, 1988). La première est la nifédipine, un bloqueur des canaux calciques et la seconde, le BayK 8644, un activateur de ces mêmes canaux.

#### 2.3.1. Effet de la nifédipine.

Dans la figure 10, l'addition d'angiotensine II (100 nM) provoque le même type de réponse biphasique. La nifédipine (10  $\mu$ M) a été ajoutée durant la phase de plateau et l'on observe une diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  jusqu'au niveau de base. Cette même diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  a été observé avec un milieu sans calcium. Dans la figure 11c, on observe une diminution immédiate de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à l'application de la

Figure 10: Effet de la nifédipine (10  $\mu\text{M}$ ) sur la réponse de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par l'angiotensine II (100 nM) dans une cellule glomérulée de boeuf.



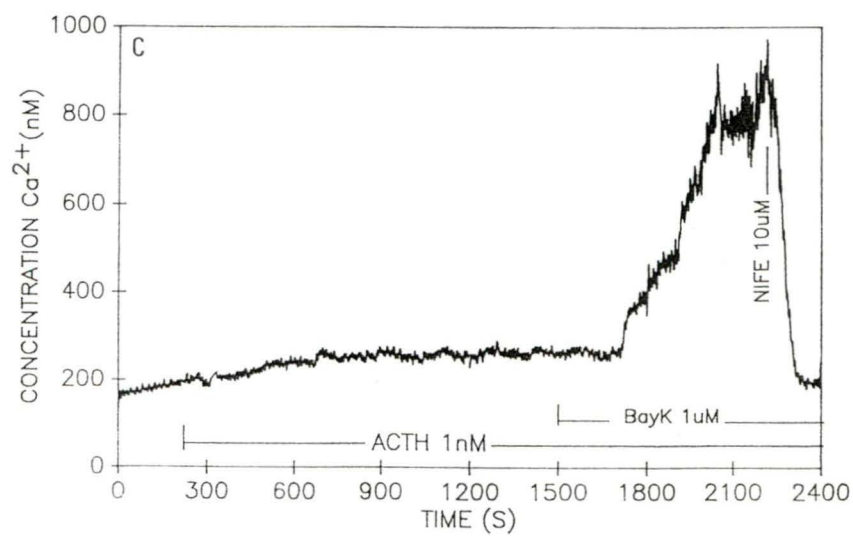
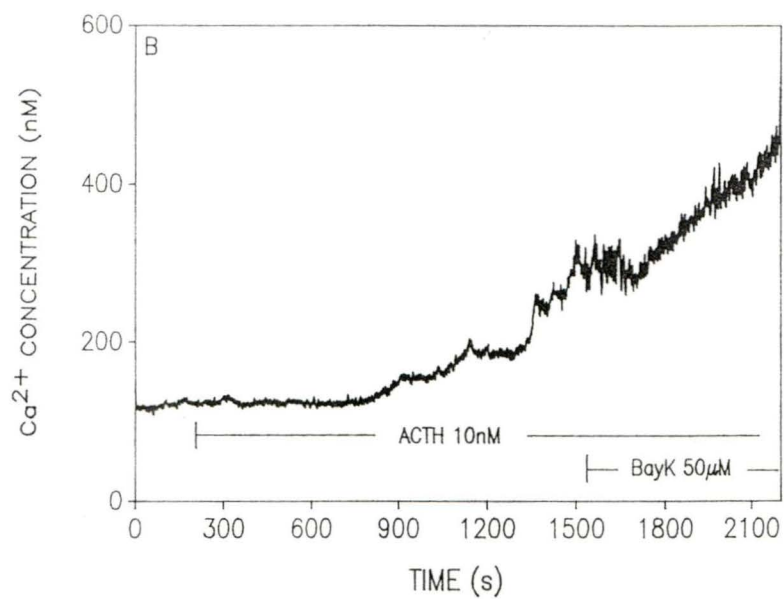
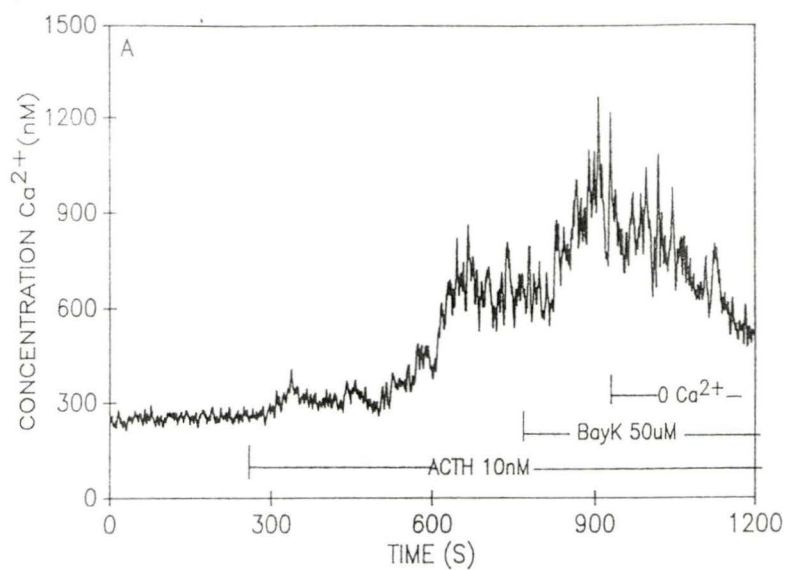


nifédipine ( $10\mu\text{M}$ ), lors de la potentialisation de la réponse à l'ACTH par le BayK 8644.

### 2.3.2. Effet du BayK 8644.

La figure 11 illustre l'implication des canaux calciques dans l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoquée par l'ACTH. Dans les figures 11a, 11b et 11c, l'ACTH provoque le même type de réponse de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que dans les figures 7a à 7d. Lorsque le plateau est atteint, le BayK 8644 ( $50\mu\text{M}$ ) est ajouté au milieu de perfusion. On observe une augmentation immédiate dans la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig.11a et 11b). On remarque la même augmentation dans la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  avec une concentration de  $1\mu\text{M}$  de BayK 8644 (Fig.11c). En présence de BayK 8644, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est augmentée de 88% comparée à l'ACTH seul. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  passe de  $190.0 \pm 49.4$  nM dans des conditions basales à  $416.6 \pm 51.1$  nM en présence d'ACTH et à  $783.3 \pm 64.2$  nM avec l'ACTH + BayK 8644 ( $n=4$ ). Cet effet de potentialisation du BayK 8644 est dépendant du calcium extracellulaire, car lorsque l'on change le milieu de perfusion normal pour un milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.11a) ou si on rajoute de la nifédipine (Fig.11c), la réponse est abolie. Il est important de noter que le BayK 8644 seul n'a aucun effet sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Figure 11: Effet du BayK 8644 sur la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH dans des cellules glomérulées de surrenale de boeuf: les tracés A et B illustrent l'effet du BayK 8644 (50  $\mu$ M) sur l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH (10 nM). On remarque que suite à l'application du BayK 8644 il y a une augmentation immédiate de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Le tracé C montre l'effet de la nifédipine (10  $\mu$ M) sur l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH (1 nM) et le BayK 8644 (1 $\mu$ M). On peut observer que même si la cellule n'a pas bien répondu à l'ACTH, le BayK 8644 a provoqué une augmentation rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$ , qui est complètement inhibée par l'addition de nifédipine.



2.4. Effets de différentes substances qui augmentent l'AMPC intracellulaire sur la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  induit par l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.

Les expériences qui suivent ont pour but de déterminer si l'AMPC joue un rôle dans l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  lors d'une stimulation par l'ACTH. Pour cela nous avons utilisé deux substances qui ont comme propriété d'augmenter l'AMPC intracellulaire. La première est un analogue de l'AMPC, le 8-bromo-AMPC, qui peut traverser la membrane cellulaire. La seconde est le fluorure d'aluminium,  $AlF_4^-$ , qui est un activateur non spécifique de la sous-unité  $\alpha$  des protéines  $G_s$ .

2.4.1. Effet du 8-bromo-AMPC.

Dans 50% des cellules que nous avons étudiées, l'application du 8-bromo-AMPC (1mM) a induit une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  laquelle apparaît beaucoup plus rapidement (<2min) que celle observée avec l'ACTH (Fig. 12a). Cependant, la phase de plateau, que l'on observe avec l'ACTH, ne l'est pas avec le 8-bromo-AMPC, et la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue lentement vers des valeurs de base. Dans la figure 12b, après avoir atteint le plateau suite à la l'application de 8-bromo-AMPC (1mM), on a rajouté du BayK 8644 ( $1\mu M$ ) et l'on observe une augmentation rapide de  $[Ca^{2+}]_i$ , telle qu'observée avec l'ACTH dans la fig 11.



#### 2.4.2. Effet du fluorure d'aluminium.

Dans la figure 13a à 13d, on observe que l'effet de l' $\text{AlF}_4^-$  (10 à 20mM) sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est beaucoup plus rapide que celui provoqué par l'ACTH (moins de 5min). L'atteinte du plateau se produit rapidement, et la réponse est transitoire même en présence de stimulus. Dans la figure 13d, l' $\text{AlF}_4^-$  (10 mM) induit une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui requiert la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  externe, puisqu'en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de perfusion, nous n'observons pas de réponse. Dès que la cellule est perfusée avec un milieu contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  (1.1 mM), la réponse apparaît immédiatement.

#### 2.5. Effet d'un inhibiteur de la protéine kinase dépendante de l'AMPC sur la réponse de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par l'ACTH sur des cellules glomérulées en culture.

Dans cette expérience nous avons voulu déterminer si les protéines phosphorylées par l'AMPC, les protéines kinases A (PKA) jouent un rôle dans la réponse de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ces PKA sont activées lors d'une augmentation de la concentration de l'AMPC à l'intérieur de la cellule (CATERALL, 1988; ARTALEJO, 1990). On a observé qu'une augmentation de l'AMPC intracellulaire produisait une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans la cellule (Fig.12 et 13). Il est important de vérifier si cette augmentation de

Figure 12: Effet du 8-bromo-AMPC sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules glomérulées de surrenale de boeuf: le tracé A montre que le 8-bromo-AMPC (1mM) provoque une augmentation transitoire de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Le tracé B illustre une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le 8-bromo-AMPC (1mM) et que le BayK 8644 (1 $\mu$ M) potentialise la réponse provoqué par le 8-bromo-AMPC.

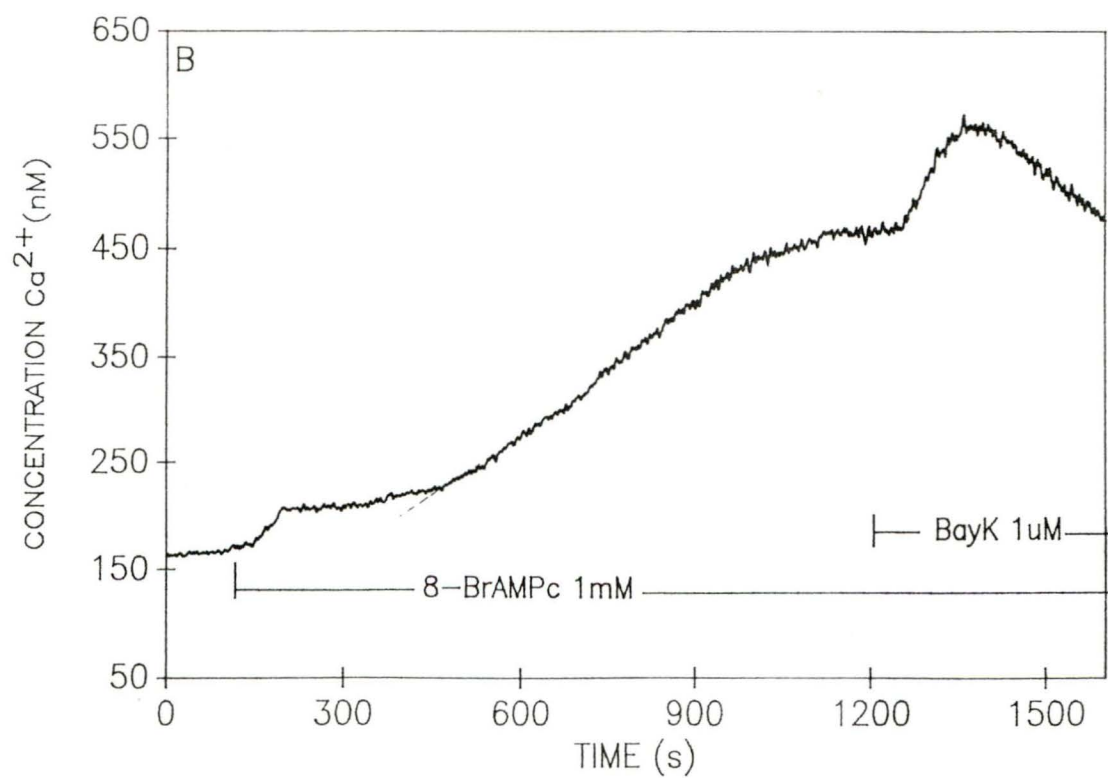
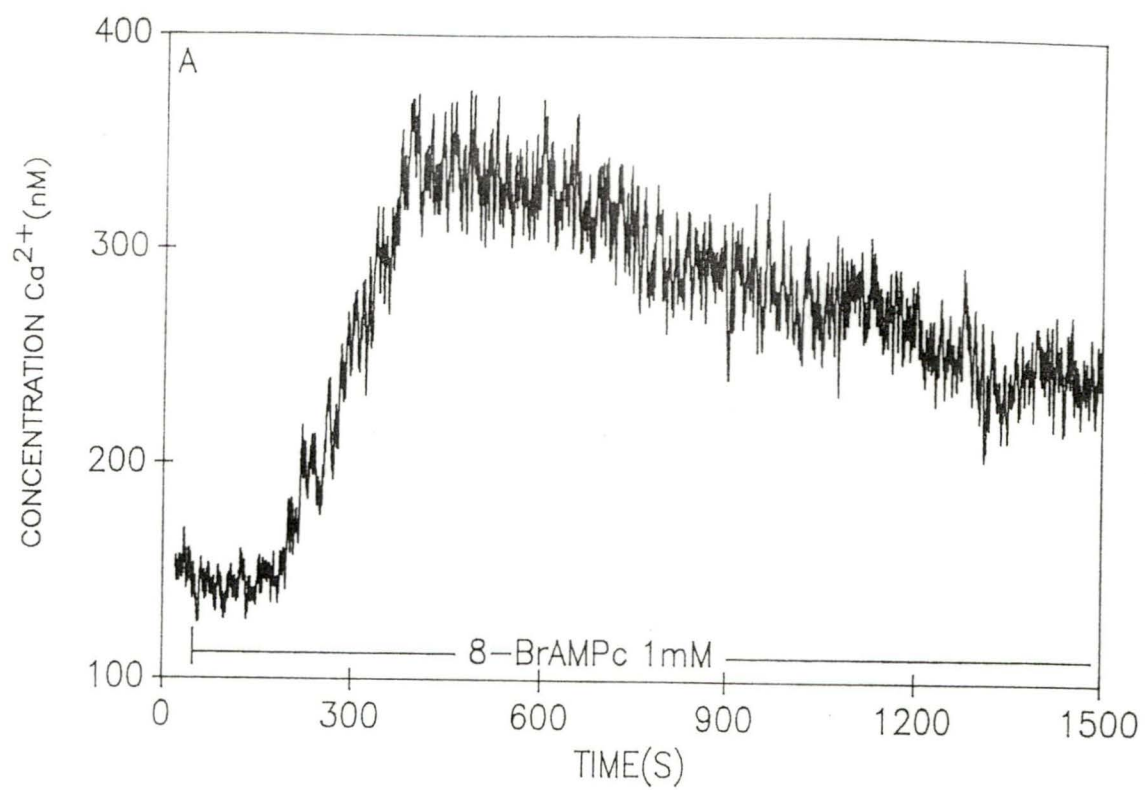
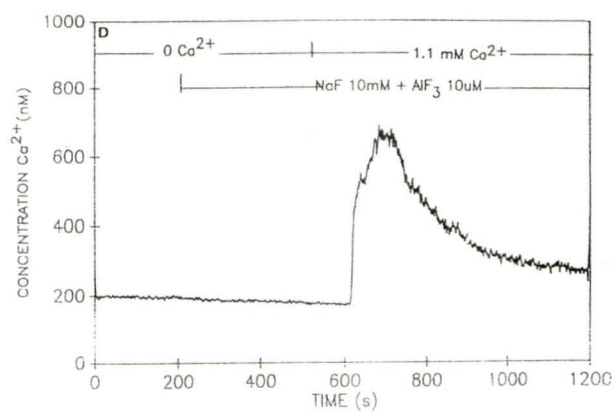
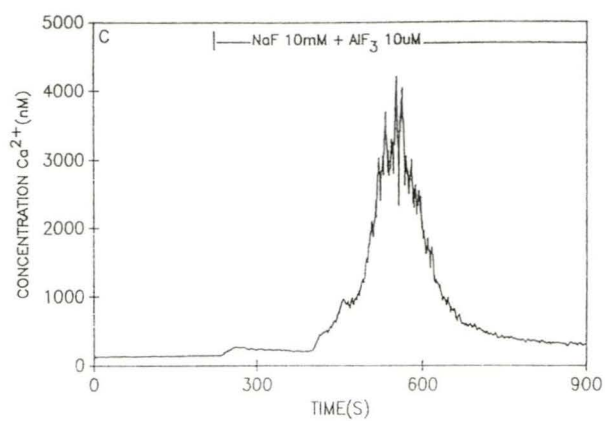
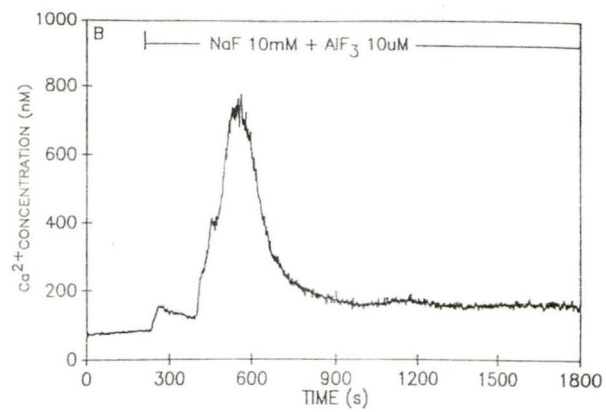
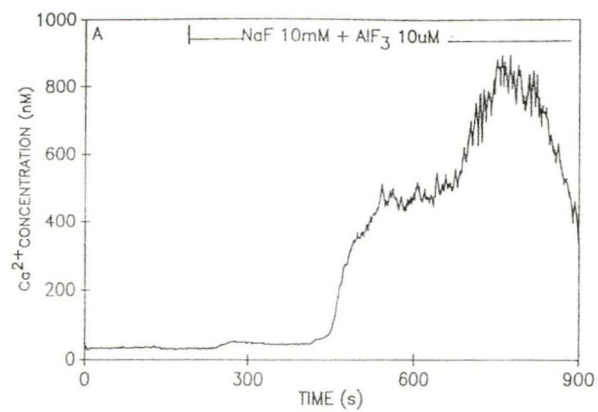


Figure 13: Effet du fluorure d'aluminium ( $\text{AlF}_4^-$ ) sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans des cellules glomérulées de surrenale de boeuf: les tracés A-C illustrent les changements dans la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induits par l' $\text{AlF}_4^-$  (10 mM). On peut observer que l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est très transitoire. Le tracé D montre l'effet d'un milieu sans calcium lors d'une stimulation par l' $\text{AlF}_4^-$  (10 mM). On remarque qu'en absence de calcium extracellulaire il n'y a aucune augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Lorsqu'on rajoute le calcium extracellulaire la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente immédiatement.





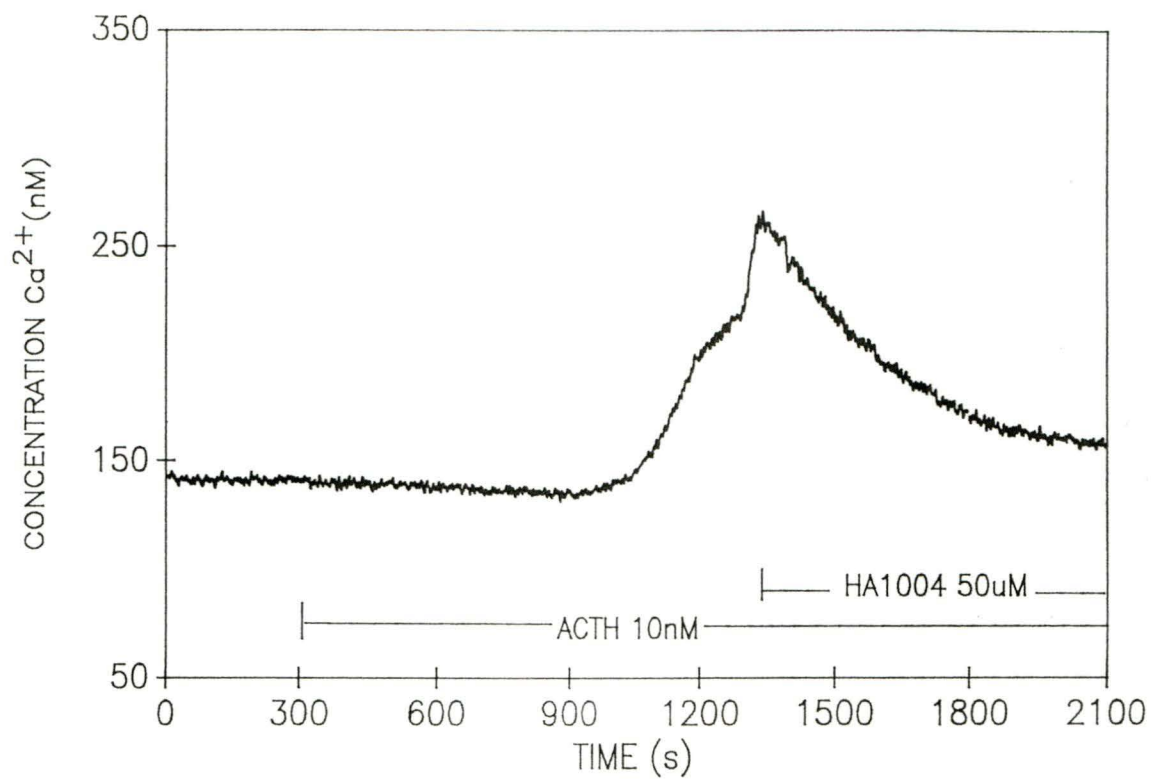
$Ca_i$  est médiée par les PKA. Lors de cette expérience, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique des PKA, le HA1004 (Seikagaku America, Inc), un dérivé d'isoquinolinesulfonamide. Celui-ci inhibe les PKA en se liant directement sur la molécule (HIDAKA et coll., 1984).

Dans la figure 14, on observe que l'addition d'ACTH (10 nM) provoque une augmentation lente et progressive de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Dès que l'on ajoute du HA1004 (50  $\mu$ M) durant la phase d'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , on observe une diminution rapide de  $[Ca^{2+}]_i$  jusqu'à un niveau légèrement supérieur au niveau de base.

### 3. Mesures de calcium intracellulaire par la technique d'imagerie.

L'avantage de la technique d'imagerie comparativement à la microspectrofluorométrie est que l'imagerie nous permet de visualiser les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'intérieur d'un petit groupe de cellules. Dans les expériences suivantes, nous avons enregistré des images d'un petit groupe de cellules glomérulées de boeuf, suite à une stimulation avec soit l'angiotensine II ou soit l'ACTH. Le but de ces expériences est de localiser la provenance de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , lors d'une stimulation avec différentes hormones.

Figure 14: Effet du HA1004 sur l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH dans une cellule glomérulée de surrenale de boeuf: sur ce tracé on peut observer que l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoqué par l'ACTH (10nM) est inhibée par le HA1004 (50 $\mu$ M), un bloqueur des protéines kinase A.

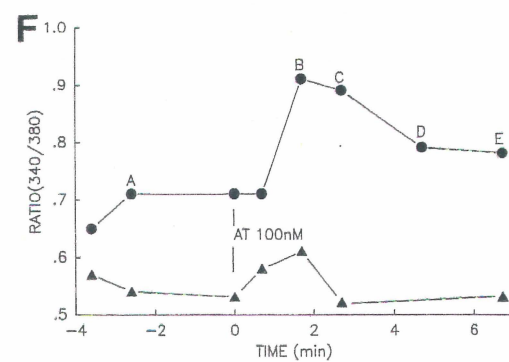
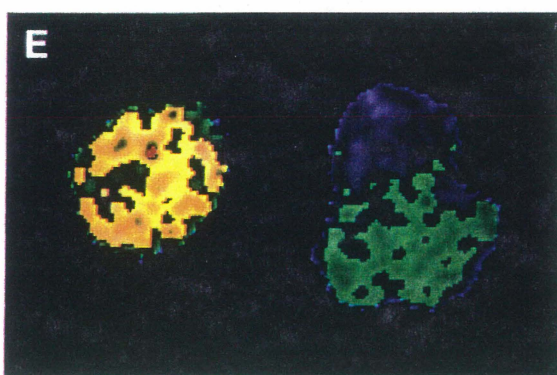
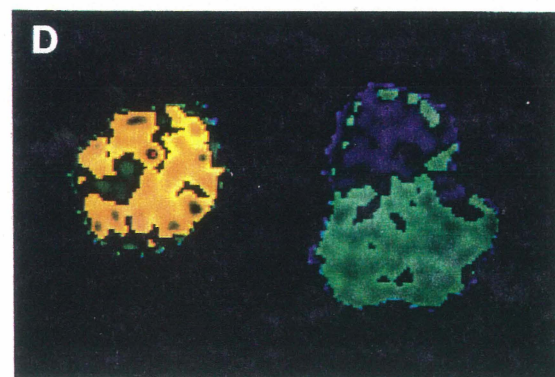
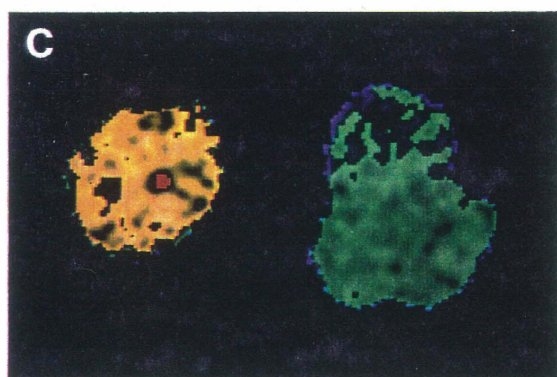
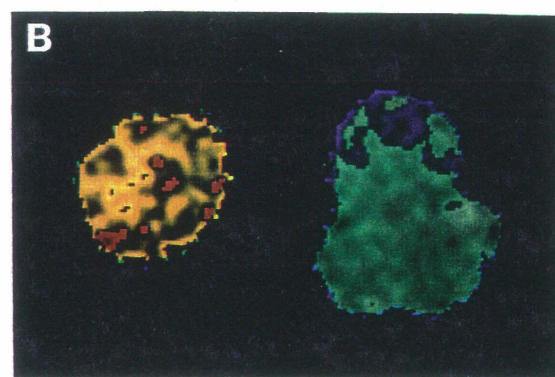
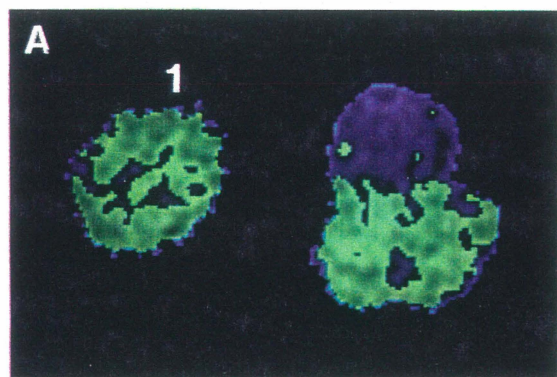


### 3.1. Changements de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'angiotensine II.

La figure 15 montre les images pseudocolorées en rapport ( $F_{340}/F_{380}$ ) de cellules glomérulées de boeuf chargées en FURA 2. On observe une cellule isolée (à gauche) et trois cellules groupées (à droite). Dans les cellules témoins- i.e. sans stimulation hormonale- on observe de grandes variations de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'intérieur de la même cellule aussi bien qu'entre les différentes cellules (Fig. 15a). Les figures 15b à 15e montrent la distribution du  $[Ca^{2+}]_i$  après 2, 3, 5 et 7 min l'addition de 100 nM d'angiotensine II, respectivement. Tel que montré à la figure 15b, l'addition de l'angiotensine II induit une augmentation rapide de  $[Ca^{2+}]_i$  qui est distribuée uniformément à l'intérieur de la cellule. Des régions restreintes colorées en rouge indiquent qu'une augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  s'est produite dans quelques régions de la cellule seulement. Après le pic initial (2 min), on remarque une phase de plateau soutenu dans la  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 15c à 15e). A noter que le groupe de cellules sur la droite a répondu très légèrement à l'angiotensine II. La figure 15f illustre les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induit par l'angiotensine II en fonction du temps. Les rapports moyens (de la cellule #1 et du groupe de cellules) ont été déterminés à l'aide de l'analyse des images par histogramme. Ces rapports moyens sont représentés sous forme de graphique en fonction du temps. Le profil de  $[Ca^{2+}]_i$  de la figure 15f est similaire à ceux



Figure 15: Changements de la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'angiotensine II analysées par la technique d'imagerie. Cette figure montre les images sous forme de rapports pseudocolorées de cellules glomérulées de surrénale de boeuf stimulées par l'angiotensine II (100nM). La figure A montre les cellules à l'état de repos. Les figures B-E montrent la distribution du calcium intracellulaire 2, 3, 5 et 7 min, respectivement après l'addition de 100 nM d'angiotensine II. On remarque que l'addition de l'angiotensine II induit une augmentation rapide de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Par la suite on observe une légère diminution dans la valeur du rapport (D,E), ce qui correspond à la phase de plateau. La figure F illustre les changements de la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'angiotensine II. Les rapports moyens ont été portés en graphique en fonction du temps avec les valeurs qui ont été déterminées par analyse d'images par histogramme à chaque intervalle de temps.



décrits dans les figures 5a à 5c.

### 3.2. Changements de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'ACTH.

La figure 16 montre trois cellules glomérulées de boeuf. La figure 16a montre les cellules non stimulées et les figures 16b à 16d, montre les mêmes cellules après 7.5, 11 et 15 min après l'addition de 10 nM d'ACTH, respectivement. On observe différents profils de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . Dans la cellule #3, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  se produit uniformément autour de la membrane cellulaire (Fig.16b), suivie d'une élévation majeure de  $[Ca^{2+}]_i$  et beaucoup plus intense au niveau de la périphérie cellulaire (Fig.16c), et finalement une grande augmentation à travers toute la cellule (Fig.16d). Au contraire, les cellules #2 et #3 répondent à l'ACTH par une augmentation uniforme à travers toute la cellule (Fig. 16b à 16d).

La figure 17 montre un exemple d'un changement de  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à l'ACTH dans des cellules glomérulées de boeuf. Les figures 17a et 17b représentent les cellules non stimulées tandis que les figures 17c à 17h représentent les cellules 2, 6, 8, 11, 12 et 13 min suivant l'application de 10 pM d'ACTH, respectivement. Dans les deux cellules, on observe une augmentation locale à travers le cytoplasme, suivi d'une phase de plateau soutenue pour la cellule #1 ou des régions intenses illustrées par des taches rouges dans la cellule #2, qui est



Figure 16: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à l'ACTH analysées par la technique d'imagerie. Les figures A-D montrent les images sous forme de rapports pseudocolorées de trois cellules glomérulées de boeuf stimulées avec de l'ACTH (10 nM). La figure A montre les cellules non stimulées et les figures B-D, 7.5, 11 et 15 min, respectivement après l'application de l'ACTH. Ces trois cellules sont caractérisées par une réponse hétérogène en  $[Ca^{2+}]_i$ . Dans la cellule 3, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est localisée principalement à la périphérie cellulaire (C), et finalement qui se propage à travers toute la cellule (D). Par contre, les cellules 2 et 3 ont répondu à l'ACTH par une augmentation uniforme à travers tout le cytoplasme (B, C et D).

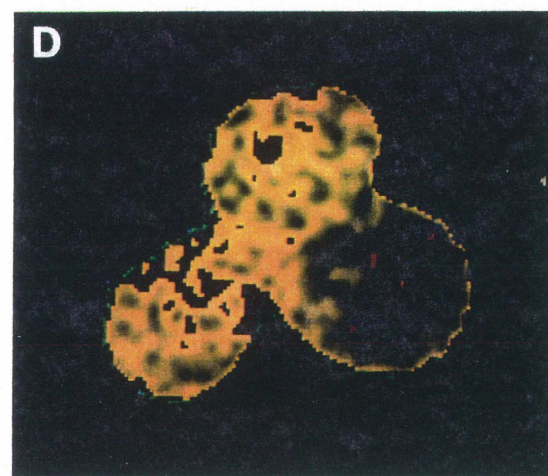
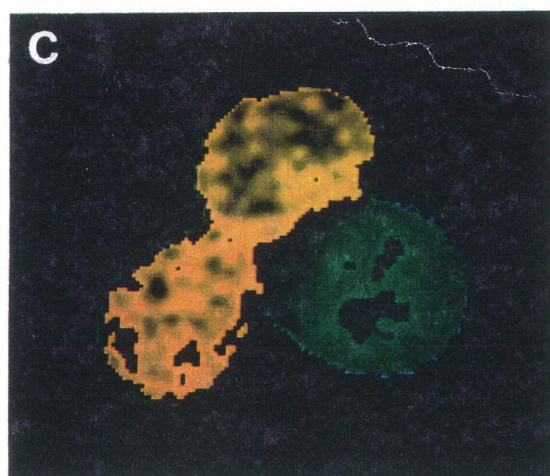
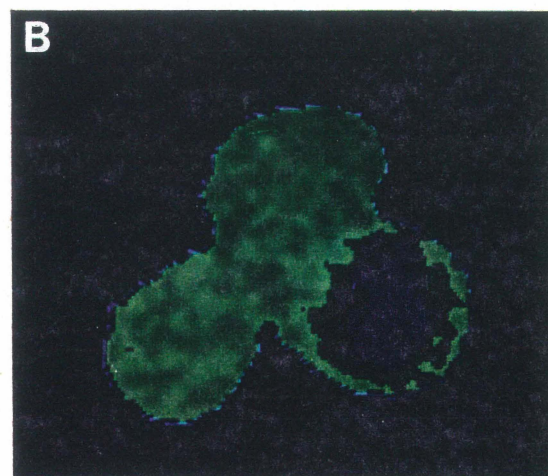
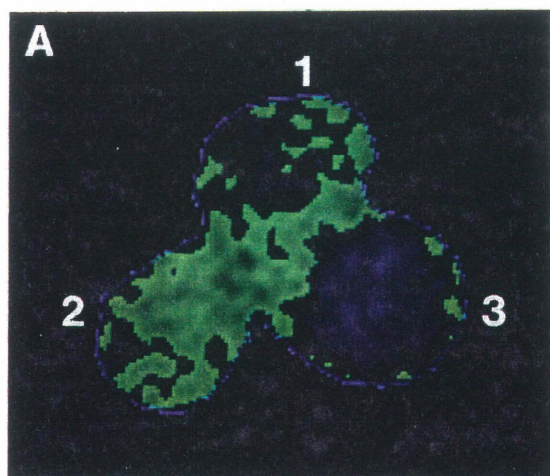
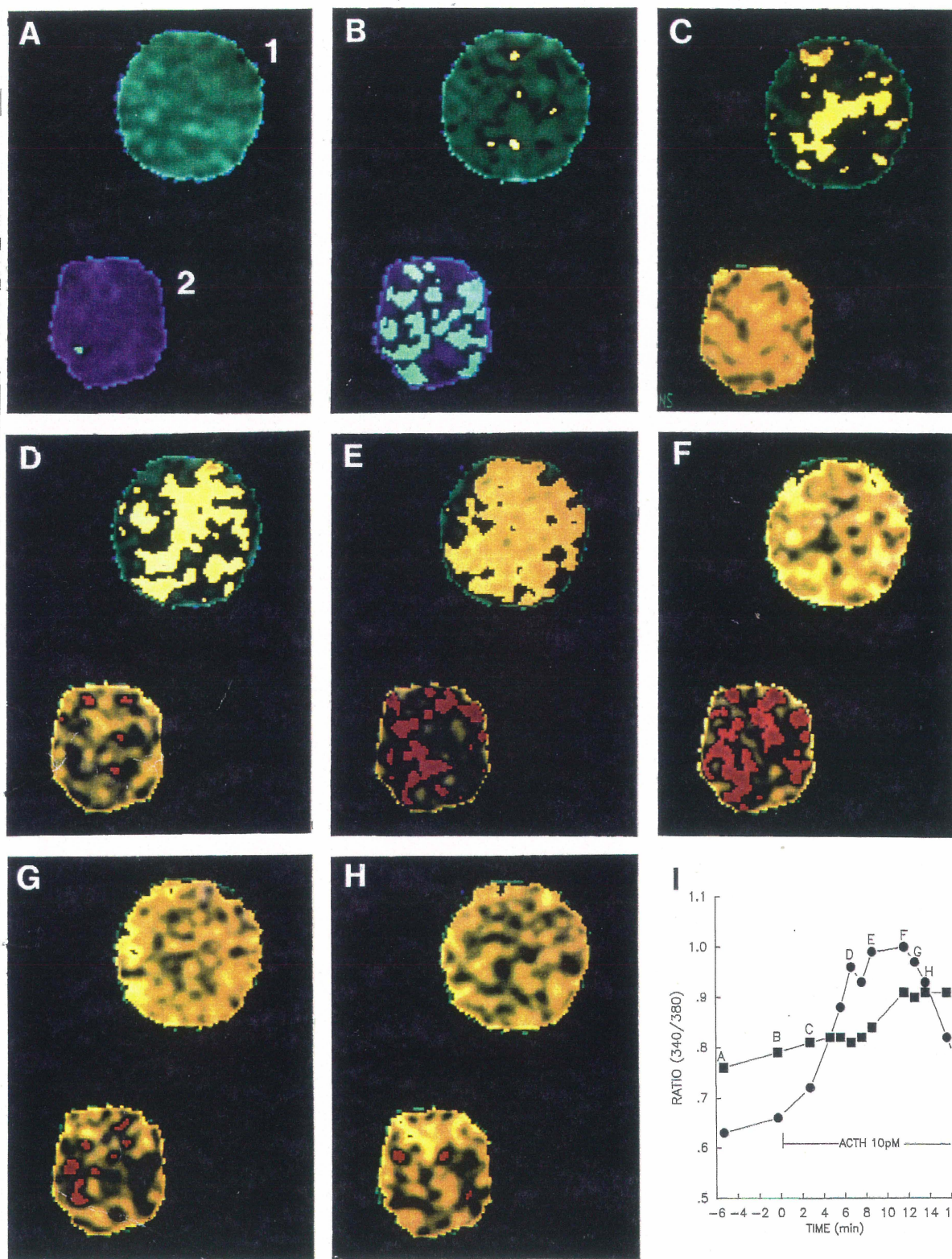




Figure 17: Changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'ACTH analysées par imagerie. Ces images montrent les augmentations progressives induites par l'ACTH dans deux cellules glomérulées de boeuf individuelles. Les figures A et B montrent les cellules à l'état de repos tandis que les figures C-H montrent les cellules à 2, 6, 8, 11, 12 et 13 min après l'application de 10 pM d'ACTH, respectivement. La figure I illustre les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  induits par l'ACTH. Les rapports moyens sont représentés en graphique en fonction du temps avec les valeurs déterminées par l'analyse des images par histogramme à chaque intervalle de temps. Les points A à H indiquent la  $[Ca^{2+}]_i$  correspondante aux images montrées plus haut.





suivi d'un plateau. La figure 17i montre les rapports moyens de  $[Ca^{2+}]_i$  déterminés à l'aide de l'analyse d'images par histogramme à divers intervalles de temps. Celles-ci montre le même profil de réponse que celles illustrées à la figure 7.

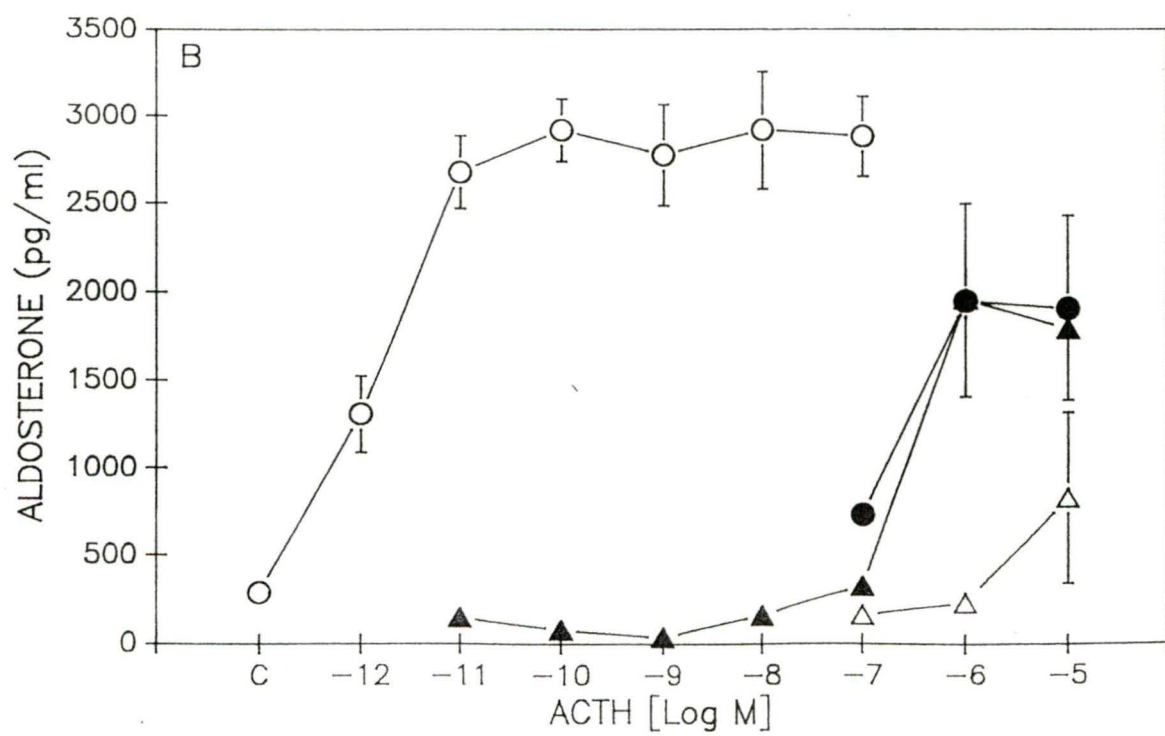
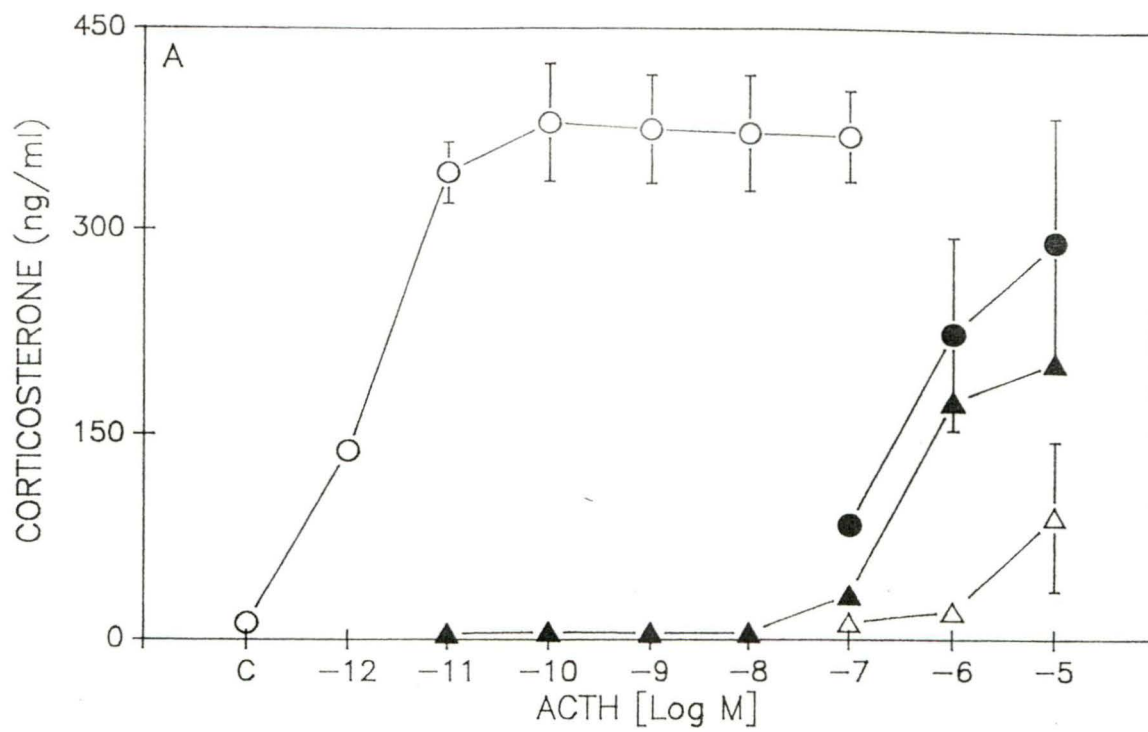
#### 4. Mesures de sécrétions hormonales.

##### 4.4.1 Effet de l'ACTH<sub>1-24</sub> et des fragments, ACTH<sub>1-10</sub> et ACTH<sub>11-24</sub>, sur la sécrétion de la corticostérone et de l'aldostérone par des cellules glomérulées en culture.

Les figures 18a et 18b représentent les courbes action-dose de la sécrétion de corticostérone et de l'aldostérone induites par l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub> par des cellules glomérulées de surrénale de rat au troisième jour de culture. Tout d'abord on observe que la sécrétion maximale de corticostérone et d'aldostérone est atteinte à de faibles concentrations ( $10^{-11}M$ ) d'ACTH<sub>1-24</sub>. Par la suite, ce niveau de sécrétion se maintient en un plateau en présence de concentrations plus élevées d'ACTH<sub>1-24</sub> ( $10^{-11}$  à  $10^{-7} M$ ).

Pour ce qui est de la sécrétion de stéroïdes induite par les fragments d'ACTH<sub>1-10</sub> et d'ACTH<sub>11-24</sub>, on observe que ces derniers induisent une sécrétion de corticostérone et d'aldostérone à des concentrations très élevées ( $10^{-7}$  à  $10^{-5}M$ ). Si on compare l'effet des deux fragments, l'ACTH<sub>1-10</sub> est beaucoup plus puissant que l'ACTH<sub>11-24</sub> aux mêmes concentrations.

Figure 18: Courbes action-dose de la sécrétion de corticostérone (A) et de l'aldostérone (B) induite par l'ACTH<sub>1-24</sub> (○), l'ACTH<sub>1-10</sub> (●), l'ACTH<sub>11-24</sub> (△) et ACTH<sub>1-10</sub>+ACTH<sub>11-24</sub> (▲) sur des cellules glomérulées de surrénale de rat au troisième jour de culture, dans un milieu contenant une concentration physiologique de calcium. Au troisième jour de culture, les cellules ont été incubées pendant deux heures à 37°C. Après l'incubation les surnageants ont été recueillis et le dosage de chaque hormone a été effectué.



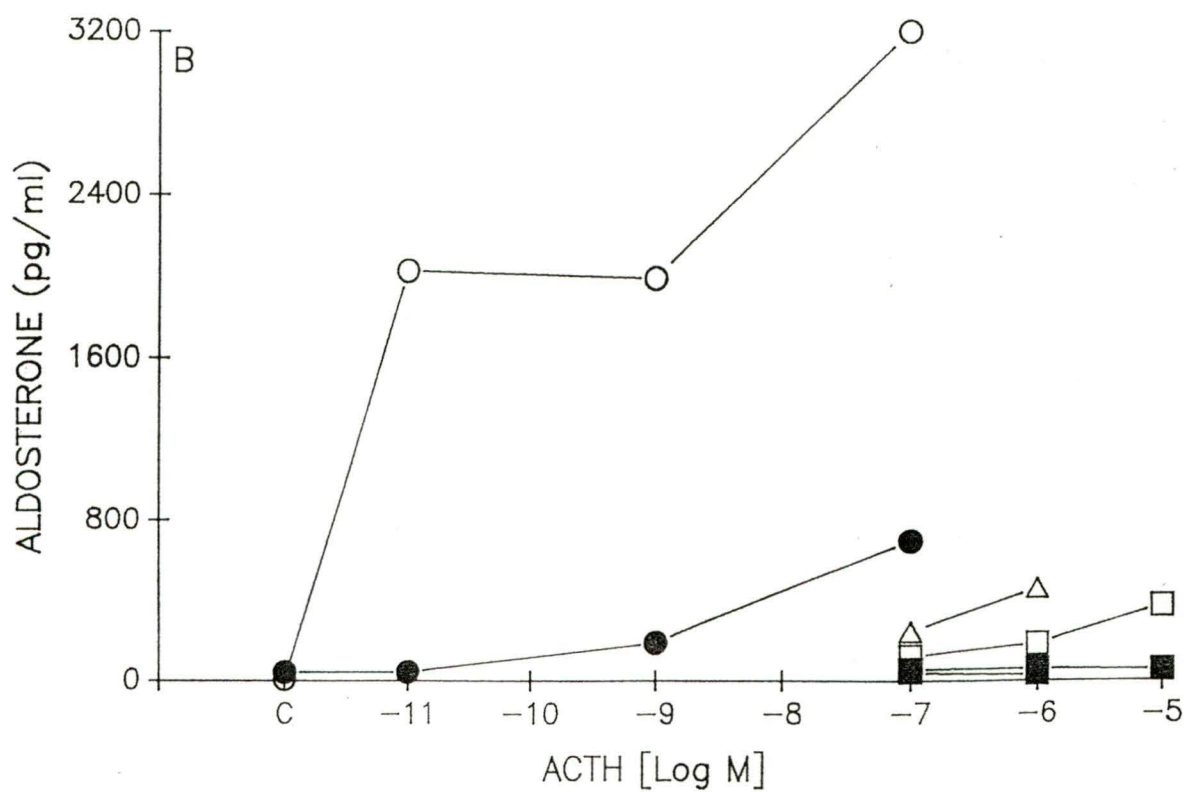
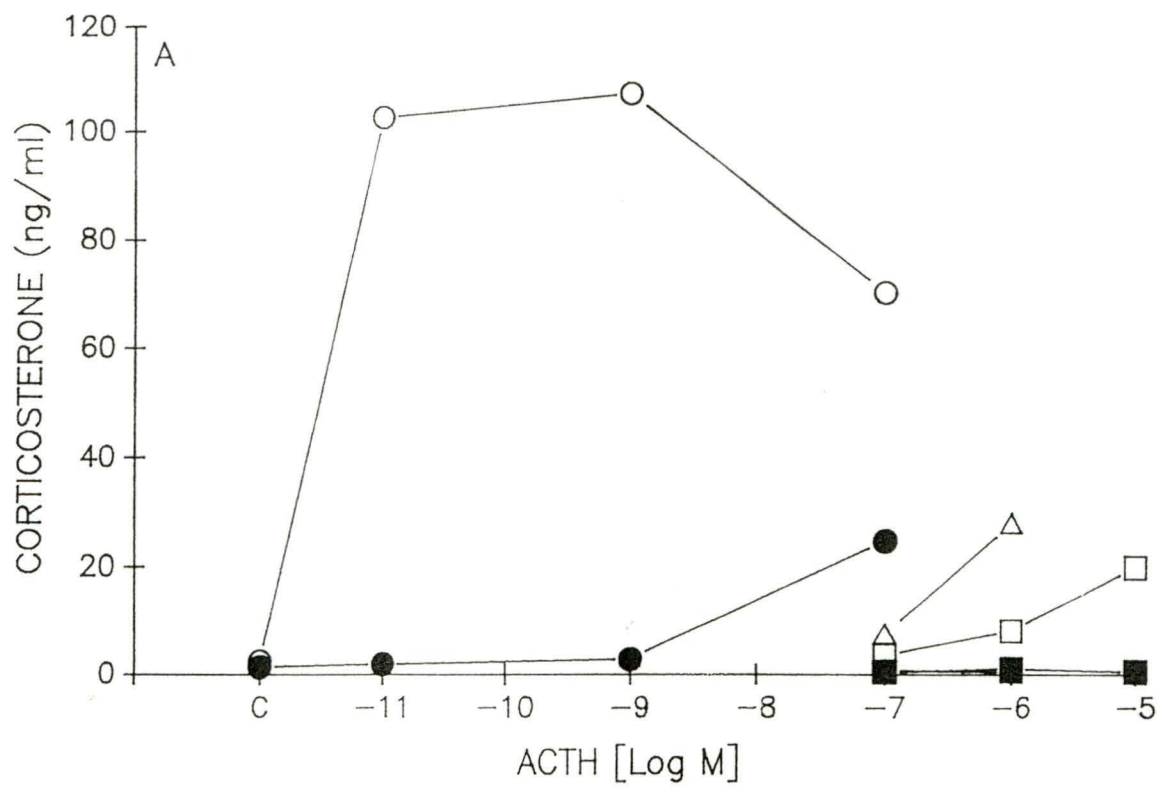


Par contre, l'addition des deux fragments, simultanément, ne reproduit en aucun cas l'effet de la molécule entière ( $\text{ACTH}_{1-24}$ ).

4.2. Effet d'un milieu sans calcium sur la sécrétion de stéroïdes induite par l' $\text{ACTH}_{1-24}$ , l' $\text{ACTH}_{1-10}$  et l' $\text{ACTH}_{11-24}$  par des cellules glomérulées en culture.

L'expérience a été réalisée sur des cellules glomérulées de surrénale de rat au troisième jour de culture. Dans la figure 19a, nous observons une forte inhibition de la sécrétion de corticostérone lors de la stimulation dans un milieu sans calcium. Les sécrétions induites par l' $\text{ACTH}_{1-24}$  ( $10^{-7}\text{M}$ ), l' $\text{ACTH}_{1-10}$  ( $10^{-6}\text{M}$ ) et l' $\text{ACTH}_{11-24}$  ( $10^{-5}\text{M}$ ) ont été inhibées de 65, 98 et 98%, respectivement. Nous observons le même effet pour la sécrétion de l'aldostérone (Fig.19b). Les sécrétions induites par l' $\text{ACTH}_{1-24}$  ( $10^{-7}\text{M}$ ), l' $\text{ACTH}_{1-10}$  ( $10^{-6}\text{M}$ ) et l' $\text{ACTH}_{11-24}$  ( $10^{-5}\text{M}$ ) ont subi une inhibition de 78, 93 et 85%, respectivement.

Figure 19: Courbes action-dose de la sécrétion de corticostérone (A) et de l'aldostérone (B) induite par l'ACTH<sub>1-24</sub> (○), l'ACTH<sub>1-10</sub> (△) et l'ACTH<sub>11-24</sub> (□) dans un milieu contenant du calcium 1.1 mM (symbole vide) et sans calcium (symbole plein) sur des cellules glomérulées de surrénale de rat au troisième jour de culture. Les cellules ont été incubées pendant deux heures à 37°C en présence des stimuli. Après l'incubation les surnageants ont été recueillis pour effectuer le dosages des hormones.



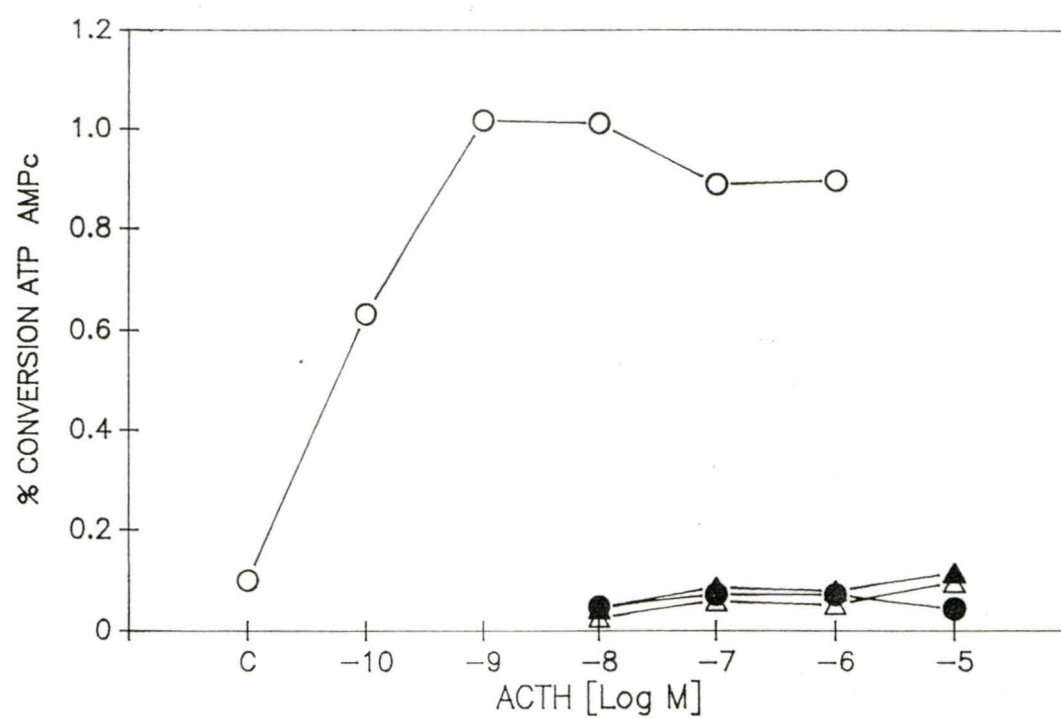
## 5. Mesures d'AMPc intracellulaire.

### 5.1. Effet de l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub> sur la production d'AMPc dans des cellules glomérulées en culture.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules glomérulées de rat au troisième jour de culture. La figure 20 représente la courbe action-dose de la production d'AMPc induite par l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub> et l'ACTH<sub>11-24</sub>. Nous observons que la production d'AMPc atteint son maximum à une concentration de  $10^{-9}$ M d'ACTH<sub>1-24</sub>, pour ensuite se maintenir jusqu'à une concentration de  $10^{-6}$ M d'ACTH<sub>1-24</sub>. Les fragments ACTH<sub>1-10</sub> et ACTH<sub>11-24</sub> n'ont pas induit la production d'AMPc. On note aussi que l'addition simultanée des deux fragments n'induit pas de production d'AMPc dans les cellules glomérulées.

Figure 20: Courbe action-dose de la production d'AMPC induite par l'ACTH<sub>1-24</sub> (○), l'ACTH<sub>1-10</sub> (▲), l'ACTH<sub>11-24</sub> (●) et ACTH<sub>1-10</sub>+ACTH<sub>11-24</sub> (Δ) sur des cellules glomérulées de surrénale de rat au troisième jour de culture. Au troisième jour de culture, les cellules ont été chargées pendant une heure avec de l'adénine tritiée. Puis elles ont été incubées pendant 15 min avec les stimuli. Par la suite les cellules ont été lysées et les surnageants ont été recueillis pour mesurer le pourcentage de conversion de l'ATP en AMPc.





#### IV. DISCUSSION.

##### 1. Niveau basal de calcium intracellulaire.

La régulation du calcium intracellulaire est certainement l'un des champs de la biologie le plus intensément étudié depuis les des 20 dernières années (BERRIDGE, 1990; BERRIDGE, 1989; JACOB et coll., 1988). Une conclusion qui émerge de ces tous résultats est que, indépendamment du type cellulaire, la concentration cytosolique de calcium libre,  $[Ca^{2+}]_i$ , est faible variant entre 60 et 200 nM dans la plupart des types de cellules. La concentration de  $[Ca^{2+}]_i$  basale que nous avons observée dans les cellules glomérulées de rat et de boeuf se situe dans le même ordre de grandeur que celle déjà reportée pour les mêmes cellules (QUINN et et coll., 1988; JOHNSON et coll., 1989) ainsi que dans d'autres types cellulaires (WEISSBERG et coll., 1989; MOLGAROLI et coll., 1990; SCHLEGEL et coll., 1987; PAYET et coll., 1990).

La mesure de  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules uniques montre souvent que plusieurs cellules produisent des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'état basal. Sur le tracé de la figure 4 on peut observer sur une cellule glomérulée de boeuf, que l'amplitude de ces oscillations varie sur la même cellule et qu'elles disparaissent après un certain temps. Ces oscillations ont déjà été décrites dans des cellules vasculaires de muscle lisse (WEISSBERG et coll., 1989), des cellules somatotropes

(THORNER et coll., 1988), des cellules chromaffines (MOLGAROLI et coll., 1990), des cellules hypophysaires  $GH_3$  (SCHLEGEL et coll., 1987) et des lymphocytes (PAYET et coll., 1990). Dans la lignée cellulaire  $GH_3$ , SCHLEGEL et coll. (1987) ont montré que ces oscillations spontanées de  $[Ca^{2+}]_i$  étaient le résultat de fluctuations de potentiels d'action. Ces mêmes potentiels d'action augmentent la  $[Ca^{2+}]_i$  via les canaux calciques dépendant du voltage. Des études effectuées dans notre laboratoire ont aussi montré que les cellules glomérulées de boeuf produisent occasionnellement des potentiels d'action spontanés (DURROUX et coll., 1991). Comparativement aux cellules glomérulées de boeuf, les oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  à l'état basal n'ont pu être observées chez les cellules glomérulées de rat. Ce phénomène s'explique très difficilement. La seule raison que l'on peut évoquer est que certains types cellulaires présentent des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  et d'autres pas.

## 2. Régulation du $[Ca^{2+}]_i$ par les stimuli.

### 2.1. Angiotensine II

L'angiotensine II étant l'un des plus importants stimuli de la sécrétion d'aldostérone (CAPPONI et coll., 1984; PAYET, 1981; FREDLUND et coll., 1975 et 1977), nous avons étudié son effet sur la régulation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules

glomérulées de rat et de boeuf en culture.

Les résultats que nous avons obtenus suite à une stimulation avec l'angiotensine II corroborent ceux décrits par QUINN et coll. (1988) et JOHNSON et coll. (1989) sur des cellules glomérulées de boeuf fraîchement isolées. Les expériences que nous avons réalisées montrent que l'angiotensine II, à des concentrations de 5 et 100 nM, peut induire deux types de réponses selon la  $[Ca^{2+}]_i$  que l'on retrouve à l'état basal: 1) lorsque que la  $[Ca^{2+}]_i$  basale est stable, la réponse induite par l'angiotensine II est caractérisée soit par un pic initial transitoire suivi d'une phase secondaire soutenue de  $[Ca^{2+}]_i$  ou soit par l'apparition d'oscillations. 2) lorsque que des oscillations sont présentes initialement, l'angiotensine II induit une augmentation de la fréquence de ces oscillations. On constate que l'absence de  $Ca^{2+}$  dans le milieu de perfusion inhibe les oscillations.

On peut remarquer que lors d'une stimulation par l'angiotensine II dans un milieu sans  $Ca^{2+}$ , l'apparition de la phase secondaire soutenue de  $Ca^{2+}$  ne se produit pas. Ces résultats nous indiquent que le pic initial de  $[Ca^{2+}]_i$  produit par la stimulation de l'angiotensine II est indépendant du  $Ca^{2+}$  extracellulaire. Ce pic de  $[Ca^{2+}]_i$  est le résultat de la mobilisation de  $Ca^{2+}$  à partir de "pools" intracellulaires de  $Ca^{2+}$  sans doute sensibles à l' $IP_3$ , tel le réticulum endoplasmique (PRENTKI et coll., 1984) ou encore d'organites spécialisés tels les "calciosomes" (VOLPE et coll., 1988).



D'autre part, la phase secondaire que l'on observe suite au pic initial est produite par un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ , via des canaux calciques dépendant du voltage, puisqu'en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ou lors d'application d'un bloqueur de canal calcique, la nifédipine, nous inhibons la phase de plateau. Le rôle de cette phase secondaire est de remplir les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$ , lesquelles ont été mobilisées et épuisées lors de la phase initiale de la réponse (BERRIDGE et GALLIONE, 1988; BERRIDGE et IRVINE, 1989; BERRIDGE, 1990).

Des oscillations déclenchées par un stimulus ont été aussi observées sur d'autres types cellulaires, tels les hépatocytes (WOODS et coll., 1986), les gonadotropes (SHANGOLD et coll., 1988) et les cellules endothéliales (JACOB et coll., 1988). Nos résultats sont en accord avec ceux publiés pour d'autres types cellulaires, les oscillations de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sont dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, puisqu'elles cessent immédiatement en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  externe.

## 2.2. ACTH.

L'AMPC a longtemps été reconnu comme l'unique second messenger de l'ACTH. Par contre, des expériences réalisées par GALLO-PAYET et coll. (1989) ont montré que l'ACTH peut induire une augmentation de la production d' $\text{IP}_3$  et aussi stimuler un influx calcique dans des cellules glomérulées de rat en culture. L' $\text{IP}_3$  étant le second messenger qui régularise le



calcium intracellulaire, il était important de vérifier si l'ACTH augmentait bien la  $[Ca^{2+}]_i$  lors de la stimulation.

Les résultats obtenus montrent que l'ACTH est capable d'induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules glomérulées de surrénale de rat et de boeuf. Le profil de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provoqué par l'ACTH est complètement différent de celui observé avec l'angiotensine II. Dans la plupart des réponses obtenus, l'ACTH induit une augmentation lente de  $[Ca^{2+}]_i$  après une période de latence variant entre 10 et 15 min. Un autre cas semblable a été récemment observé dans les cellules épithéliales du rein lors d'une stimulation avec la parathormone par BAESKAI et FRIEDMAN (1990). Ces auteurs ont observé une période de latence variant entre 10 et 12 min, et 30 min avant de voir l'apparition de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . Cette période de latence que nous observons dans la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  ne dépend en aucun cas d'une diffusion inadéquate, ni d'effet de la température et ni d'adhérence de l'hormone aux parois des tubes. La preuve que ces contraintes ne rentrent pas en ligne de compte est que sous les mêmes conditions expérimentales, l'application de l'angiotensine II induit une augmentation immédiate de  $[Ca^{2+}]_i$ . Ces résultats suggèrent que la source de  $Ca^{2+}$  impliquée dans la réponse de l'ACTH serait le milieu externe et que le  $Ca^{2+}$  pénétrerait dans la cellule via des canaux calciques.

Il a été démontré dans notre laboratoire que les cellules glomérulées possèdent les trois composantes des canaux

calciques, c'est-à-dire le canal de type T, L et N, et aussi des canaux potassiques dépendants du voltage (PAYET et coll., 1987; DURROUX et coll., 1988). L'ACTH a des effets très complexes sur ces différents canaux. Tout d'abord, lors de la stimulation avec l'ACTH, celle-ci bloque le courant potassique sortant transitoire et le courant calcique de type T, mais il augmente l'amplitude du courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L (DURROUX et coll., 1991). De plus, il a été montré que l'ACTH peut induire une dépolarisation membranaire, laquelle peut déclencher quelquefois des potentiels d'action (MATTHEWS et SAFFRAN, 1973).

Nos résultats, combinés avec les résultats précédents sur les effets de l'ACTH sur les courants calciques et les potentiels d'action, suggèrent que l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par l'ACTH résulte d'un influx de calcium via des canaux calciques sensibles aux dihydropyridines. Les expériences réalisées avec le bloqueur de canal calcique, la nifédipine, viennent appuyer cette hypothèse, puisque l'application de nifédipine bloque immédiatement et complètement l'influx calcique induit par l'ACTH. L'application du BayK 8644, un activateur de canal calcique de type L, lors de l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provoquée par l'ACTH, potentialise la réponse de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ceci est une évidence de plus que l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  se fait par des canaux calciques de type L.

CATTERALL (1988) a décrit que les canaux calciques

sensibles aux dihydropyridines ont besoin d'être phosphorylés par l'AMPC pour une activation maximale. Sachant que l'ACTH a comme second messenger l'AMPC, dans les cellules glomérulées, nous voulions vérifier si l'AMPC avait un rôle à jouer dans cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Les résultats obtenus avec le 8-bromo-AMPC, montrent que l'AMPC est définitivement impliqué dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . On remarque que le 8-bromo-AMPC provoque le même type de réponse que l'ACTH, excepté que la réponse est beaucoup plus rapide. La raison de la réponse plus rapide est que le 8-bromo-AMPC est perméable, donc sa concentration intracellulaire augmente très rapidement. De plus, cet analogue est lentement métabolisé.

Nous avons montré que l'AMPC est impliqué dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  lors d'une stimulation par l'ACTH. La question qui se pose est de savoir si l'AMPC agit directement sur les canaux calciques ou si celui-ci est un intermédiaire impliqué dans la réponse à l'ACTH. Sachant que l'AMPC active la protéine kinase A, nous avons vérifié l'effet d'un inhibiteur spécifique de la PKA, le HA1004, sur la réponse de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACTH. Les résultats obtenus montrent que la réponse induite par l'ACTH est complètement inhibée par le HA1004. Ceci suggère que le HA1004 empêche la phosphorylation des canaux calciques en inhibant la PKA. Cette dernière étant dépendante de l'AMPC, cela met en évidence que l'AMPC est un intermédiaire dans la réponse induite par l'ACTH.



Il y a un autre phénomène qui nous suggère que l'AMPC est un intermédiaire dans la réponse de l'ACTH; c'est la similitude entre le temps de latence pour obtenir une production maximale d'AMPC et celui pour observer une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Nous avons observé que la période de temps entre l'application de l'ACTH et le début de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est de 10 à 15 min. Cette période de temps correspond à celle pour obtenir une production maximale d'AMPC.

Nous avons observé quelquefois des réponses immédiates de  $[Ca^{2+}]_i$  dans quelques cellules. On peut attribuer cela à un relâchement de  $Ca^{2+}$  de pools intracellulaires sensibles à l' $IP_3$ . Comme GALLO-PAYET et coll. (1989) l'ont précédemment montré, l'ACTH stimule une production transitoire d'inositols phosphates, et on peut postuler que dans quelques cellules l'augmentation rapide et transitoire de  $[Ca^{2+}]_i$  peut être due au relâchement de  $Ca^{2+}$  de réserves intracellulaires induit par l' $IP_3$ .

L'utilisation de la technique d'imagerie nous a permis d'examiner la distribution spatiale des changements dans la  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules uniques. De plus, cette technique nous permet d'enregistrer simultanément des images d'un groupe de cellules, et aussi de confirmer l'hétérogénéité des réponses cellulaires et corroborer les résultats obtenus avec le photomultiplicateur. Les résultats obtenus en imagerie montrent que l'ACTH augmente initialement la  $[Ca^{2+}]_i$  sur la

périphérie de la cellule pour ensuite se diffuser sur toute la surface cellulaire. Lors des expériences effectuées au moyen du photomultiplicateur, nous avons constaté qu'en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire il n'y avait aucune augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suite à une stimulation par l'ACTH. Ceci confirme l'hypothèse que le  $\text{Ca}^{2+}$  provient de l'extérieur pour se diriger vers l'intérieur de la cellule.

Contrairement à l'ACTH, l'angiotensine II provoque une forte augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans toute la cellule, avec des régions plus fortement marquées en rouge, pour ensuite diminuer légèrement et se maintenir à un niveau stable. Ce même profil d'augmentation a été observé au moyen du photomultiplicateur. L'avantage de la technique d'imagerie est qu'elle nous permet de visualiser l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans la cellule. Comme nous l'avons déjà décrit, l'angiotensine II induit une réponse biphasique: une phase initiale et une phase soutenue. Les figures 15B et C illustrent bien la phase initiale où on observe une réponse rapide et transitoire, qui correspond au relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  des pools intracellulaires. Les figures 15D et E représentent la phase soutenue où on remarque une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui se maintient au dessus du niveau basal (cellule #1).



### 3. Relation structure-activité de l'ACTH.

BRISTOW et coll. (1980) ont proposé que l'ACTH, l'hormone physiologique, puisse agir via deux récepteurs. La liaison à un de ces récepteurs provoque la stéroïdogénèse via l'implication de la production d'AMPC; la liaison à l'autre récepteur stimule la stéroïdogénèse à travers d'autres mécanismes. Les auteurs ont suggéré que ces autres mécanismes impliqueraient le  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou le GMP cyclique.

LI et coll. (1989) ont mis en évidence que la partie N-terminale de l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'ACTH<sub>1-10</sub>, stimule la stéroïdogénèse via le récepteur lié à l'AMPC et que la partie C-terminale, l'ACTH<sub>11-24</sub>, stimule la stéroïdogénèse via un récepteur lié à un autre système de second messenger, probablement le calcium.

Comme nous l'avons montré dans cette étude, l'ACTH augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les cellules glomérulées de surrénales de rat et de boeuf. Afin de savoir si chacun des fragments, ACTH<sub>1-10</sub> et ACTH<sub>11-24</sub>, stimule la stéroïdogénèse via un second messenger spécifique, nous avons effectué des expériences pour mesurer les effets de ces fragments sur la sécrétion des stéroïdes et la production d'AMPC.

Les résultats des expériences sur la sécrétion de stéroïdes montrent que les fragments, ACTH<sub>1-10</sub> et ACTH<sub>11-24</sub>, à des doses physiologiques ne stimulent pas la sécrétion de corticostérone et d'aldostérone. On remarque une augmentation de la production de stéroïdes à des concentrations très

élevées ( $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M). La présence simultanée des deux fragments a provoqué une légère augmentation de corticostérone et d'aldostérone, mais à des concentrations plus élevées ( $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  M). Comparativement aux résultats de LI et coll. (1989) qui ont montré que l'addition des deux fragments avait stimulé la stéroïdogénèse de la même manière que la molécule entière, nos résultats ont démontré le contraire.

L'expérience que nous avons réalisé en présence et en absence de calcium externe est très intéressante. En absence de calcium externe, les deux fragments n'ont aucunement stimulé la sécrétion de corticostérone et d'aldostérone, tandis que l'ACTH<sub>1-24</sub> a stimulé quand même la sécrétion de stéroïdes, quoique légèrement. Ceci suggère que la présence de calcium externe est essentielle pour une stimulation maximale de stéroïdes, mais aussi que sans calcium externe, aucun des deux fragments ne stimulent les sécrétions hormonales.

Les résultats obtenus sur l'effet des fragments sur la production d'AMPC montrent que ni l'ACTH<sub>1-10</sub>, ni l'ACTH<sub>11-24</sub>, et même l'addition simultanée des deux fragments n'ont augmenté la production d'AMPC comparativement à l'ACTH<sub>1-24</sub>.

Suite à l'analyse de ces résultats, on constate que les deux fragments se comportent tout-à-fait de la même manière, et que d'aucune façon la présence des deux fragments n'a mimé l'effet de la molécule entière. Ces résultats viennent à l'encontre de l'hypothèse émise par BRISTOW et coll. (1980) et

LI et coll. (1989), qui proposaient que les fragments, ACTH<sub>1-10</sub> et ACTH<sub>11-24</sub>, stimulaient la stéroïdogénèse via deux mécanismes différents.

Ceci confirme donc que pour l'obtention d'une stimulation et d'une production de stéroïdes et d'AMPc maximales dans les cellules glomérulées de surrénales de rat et de boeuf, l'intégrité moléculaire de l'hormone adrénocorticotrope est essentielle et primordiale pour le bon fonctionnement de la régulation de la sécrétion de l'aldostérone.

## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

Les études menées lors de ce projet nous ont permis de mettre en évidence que l'angiotensine II et l'ACTH augmentent la  $[Ca^{2+}]_i$  via des mécanismes différents.

Tout d'abord, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  observée lors d'une stimulation avec l'angiotensine II est biphasique: 1) l'angiotensine II provoque une augmentation rapide et transitoire de  $[Ca^{2+}]_i$  qui est le résultat de la mobilisation de calcium de pools intracellulaires. Ce relâchement de  $Ca^{2+}$  est probablement induit par le second messenger, l' $IP_3$ . 2) la phase de plateau soutenue de  $[Ca^{2+}]_i$  provient d'un influx de  $Ca^{2+}$  via des canaux calciques dépendant du voltage, puisqu'il est inhibé par la nifédipine, un bloqueur de canaux calciques sensibles aux dihydropyridines, et qu'aussi cette phase de plateau est abolie en absence de calcium externe.

Quant à l'ACTH, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  que l'on observe est complètement différente. Celle-ci peut être divisée en deux phases: 1) la première est le temps de latence d'environ 10 à 15 min avant que l'on puisse voir apparaître l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . Cette période de temps correspond à celle qui est nécessaire pour obtenir une production maximale d'AMPC à l'intérieur de la cellule, et ainsi permettre d'activer la protéine kinase A qui peut phosphoryler les canaux calciques de type L chez ces cellules. 2) la seconde est l'augmentation lente et progressive de  $[Ca^{2+}]_i$  qui



est le résultat de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux calciques, puisque l'addition de chélateur de calcium, l'EGTA, ou de bloqueur de canal calcique, telle la nifédipine, on abolie complètement la réponse. De plus, en absence de calcium externe, aucune augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  n'a été observée suite à une stimulation à l'ACTH.

Les résultats obtenus à l'aide de la technique d'imagerie corroborent très bien ceux obtenus à l'aide du photomultiplicateur. Les images obtenues permettent de localiser la distribution spatiale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lors de l'augmentation.

Les études menées avec les analogues de l'ACTH nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les fragments  $\text{ACTH}_{1-10}$  et  $\text{ACTH}_{11-24}$  sont probablement liés au même système d'effecteur. Ces résultats suggèrent que l'intégrité moléculaire de l'ACTH est essentielle pour obtenir une réponse maximale.

A l'aide de la microspectrofluorométrie et de la technique d'imagerie, nous avons montré pour la première fois que l'ACTH augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  principalement via des canaux calciques. L'AMPC et la protéine kinase A ont un rôle primordial à jouer lors de cette augmentation, car nos résultats suggèrent que les canaux calciques doivent être phosphorylés par les PKA pour être activés. La mesure de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sur cellule unique a permis de révéler des données très intéressantes comparativement à la mesure de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sur population cellulaire.

Les prochaines expériences intéressantes à réaliser seraient de réussir à corréler la liaison hormonale, les variations de  $[Ca^{2+}]_i$ , les changements électrophysiologiques au niveau de la membrane cellulaire ainsi que de mesurer la sécrétion hormonale sur cellule unique.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Nicole Gallo-Payet pour la chance qu'elle m'a donnée de travailler au sein de son équipe et de la confiance qu'elle m'a accordée. Je suis très reconnaissant envers le Dr Marcel Daniel Payet pour ses conseils judicieux et aussi de l'aide qu'il m'a apporté lors de la réalisation de ce projet.

Je remercie sincèrement Mmes Lucie Chouinard et Lyne Bilodeau pour le soutien technique durant mes études de maîtrise. Mes remerciements vont également aux étudiants du département, Mrs Pierre Chailler et Pierre H. Vachon qui m'ont appuyé lors mes études.

Je remercie tout particulièrement mon grand ami Alain Giguère pour tous les bons conseils et les bons moments que nous avons passés ensemble.

## BIBLIOGRAPHIE.

Aguilera G., Hauger R. L., Catt K. J. (1978). Control of aldosterone secretion during sodium restriction: adrenal receptor regulation and increased adrenal sensitivity for angiotensine II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 975-979.

Ali S., Bassett J. R. (1991). The release of corticosterone and a corticosterone-binding protein by incubated rat adrenal slices. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39, 119-129.

Artalejo C. R., Ariano M. A., Perlman R. L., Fox A. P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D<sub>1</sub> dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature* 348, 239-242.

Bacskai B. J., Friedman P. A. (1990). Activation of latent Ca<sup>2+</sup> channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* 347, 388-391.

Balla T., Hollo Z., Varnai P., Spat A. (1991). Angiotensine II inhibits K<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> signal generation in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J.* 273, 399-404.



Barrett P. Q., Bollag W. B., Isales C. M. McCarthy R. T., Rasmussen H. (1989). Role of calcium in angiotensine II-mediated aldosterone secretion. *Endocrine Rev.* 10, 496-518.

Basset J. R., Pollard I. (1980). The involvement of coated vesicles in the secretion of corticosterone by the zona fasciculata of the rat adrenal cortex. *Tissue Cell* 12, 101-105.

Berridge M. J. (1990). Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265, 9583-9586.

Berridge M. J., Irvine R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.

Berridge M. J., Galione A. (1988). Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 2, 3074-3082.

Bing R. F., Schulster D. (1977). Steroidogenesis in isolated rat adrenal glomerulosa cells: response to physiological concentrations of angiotensine II and effects of potassium, serotonin and sar<sup>1</sup>-ala<sup>8</sup>-angiotensine II. *J. Endocrinol.* 74, 261-272.

Blair-West J. R., Coghlan J. P., Cran E., Denton D. A., Funder J. W., Scoggins B. A. (1973). Increased aldosterone secretion during sodium depletion with inhibition of renin release. *Amer. J. Physiol.* 224, 1409-1414.

Blair-West J. R., Coghlan J. P., Denton D. A., Goding J. R., Wintour M., Wright R. D. (1963). The control of aldosterone secretion. *Rec. Prog. Horm. Res.* 19, 311-383.

Bowyer F., Kitabachi A. E. (1974). Dual role of calcium in steroidogenesis in the isolated adrenal cell of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 100-105.

Boyd J., Palmore W. P., Mulrow P. J. (1971). Role of potassium in the control of aldosterone in the rat. *Endocrinology* 88, 556-565.

Braley L. M., Menachery A. I., Brown E. M., Williams G. H. (1986). Comparative effect of angiotensine II, potassium, adrenocorticotropin, and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate on cytosolic calcium in rat adrenal cells. *Endocrinology* 119, 1010-1019.

Braley L. M., Williams G. H. (1978). The effects of ouabain on steroid production by rat adrenal cells stimulated by angiotensine II,  $\alpha$ -<sup>1-24</sup>-adrenocorticotropin and potassium. *Endocrinology* 103, 1997-2005.

Braley L. M., Williams G. H. (1977). Rat adrenal cell sensitivity to angiotensine II,  $\alpha$ -<sup>1-24</sup>-ACTH, and potassium: a comparative study. *Amer. J. Physiol.* 233, E403-E406.

Bristow A. F., Gleed C., Fauchère J.-L., Schwyzer R., Schulster D. (1980). Effects of ACTH (Corticotropin) analogues on steroidogenesis and cyclic AMP in rat adrenocortical cells. *Biochem. J.* 186, 599-603.

Campbell D. J. (1982a). Effect of composition of incubation milieu on aldosterone and corticosterone production by isolated rat zona glomerulosa cells. *J. Endocrinol.* 94, 211-224.

Campbell D.J. (1982b). Stimulation by potassium of cholesterol depletion of rat zona glomerulosa cells "in vitro". *J. Steroid Biochem.* 17, 707-708.

Capponi A. M., Lew P. D., Jornot L., Vallotton M. B. (1984). Correlation between cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  and aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. Evidence for a difference in the mode of action of angiotensine II and potassium. J. Biol. Chem. 259, 8863-8869.

Capponi A. M., Lew P. D., Vallotton M. B. (1987). Quantitative analysis of the cytosolic-free- $\text{Ca}^{2+}$ -dependency of aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. Different requirements for angiotensine II and  $\text{K}^+$ . Biochem. J. 247, 335-340.

Catterall W. A. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channel. Science 242, 50-61.

Chartier L., Schriffrin E., Thibault G., Garcia R. (1984). Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensine II, ACTH and potassium in vitro and angiotensine II-induced steroidogenesis in vivo. Endocrinology 115, 2026-2028.

Cheitlin R., Buckley D. I., Ramachandran J. (1985). The role of extracellular calcium in corticotropin-stimulated steroidogenesis. J. Biol. Chem. 260, 5323-5327.



Cohen C. J., McCarthy R. T., Barrett P. Q., Rasmussen H. (1988). Ca channels in adrenal glomerulosa cells: K<sup>+</sup> and angiotensine II increase T-type Ca channel current. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2412-2416.

Connor J. A., Cornwall M. C., Williams G. H. (1987). Spatially resolved cytosolic calcium response to angiotensine II and potassium in rat glomerulosa cells measured by digital imaging techniques. J. Biol. Chem. 262, 2919-2927.

Debreceeni L., Csete B. (1975). "In vitro" production of aldosterone by the rat adrenals after "in vivo" potassium and sodium loading and depletion. Endocrinology 64, 316-322.

De Lean A., Racz K., McNicoll N., Desrosiers M. L. (1984). Direct  $\beta$ -adrenergic stimulation of aldosterone secretion in cultured bovine adrenal subcapsular cells. Endocrinology 115, 485-492.

Douglas J. G., Brown G. P., White C. (1984). Angiotensin II receptors of human and primate adrenal fasciculata and glomerulosa: correlations of binding and steroidogenesis. Metabolism 33, 8, 685-688.

Douglas J. G., Aguilera G., Kondo T., Catt K. J. (1978). Angiotensin II receptors and aldosterone production in rat adrenals cells. *Endocrinology* 102, 685-696.

Douglas W. W. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and others cells. *Brit. Pharmacol.* 34, 451-474.

Durroux T., Gallo-Payet N., Payet M. D. (1991). Effects of ACTH on action potentials and calcium currents in glomerulosa cells. *Endocrinology* 129, 2139-2147.

Durroux T., Gallo-Payet N., Payet M. D. (1988). Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J. Physiol.* 404, 713-729.

Enyedi P., Mucsi I., Hunyady L., Catt K. J., Spät A. (1986). The role of guanyl nucleotide binding proteins in the formation of inositol phosphates in adrenal glomerulosa cells. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 140, 941-947.

Fabiato A. (1989). Computer program for calculating total from specified free or free form specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Meth. Enzymol.* 157, Ch. 31, 378-416.

Fakunding J. L., Catt K. J. (1982). Calcium-dependent stimulation of aldosterone production in isolated adrenal glomerulosa cells: effects of ionophore A-23187. *Endocrinology* 110, 2006-2010.

Fakunding J. L., Catt K. J. (1980). Dependence of aldosterone stimulation in adrenal glomerulosa cells on calcium uptake: effects of lanthanum and verapamil. *Endocrinology* 107, 1345-1353.

Fakunding J. L., Chow R., Catt K. J. (1979). The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotropin, angiotensine II and potassium in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology* 105, 327-333.

Farese R. V., Larson R. E., Sabir M. A., Gomez-Sanchez C. E. (1983a). Effects of angiotensine II,  $K^+$ , adrenocorticotropin, serotonin, adenosine 3',5'-monophosphate, guanosine 3',5'-monophosphate, A23187, and EGTA on aldosterone synthesis and phospholipid metabolism. *Endocrinology* 113, 1377-1386.

Farese R. V., Ling N. C., Sabir M. A., Larson R. E., Trudeau W. L. (1983b). Comparison of adrecorticotropin and lys-3-melanocyte-stimulating hormone on steroidogenesis, adenosine 3',5'-monophosphate production, and phospholipid metabolism in rat fasciculata-reticularis cells-"in vitro". *Endocrinology* 105, 327-333.

Farese R. V., Rosic N., Babischkin J., Farese M. G., Foster R., Davis J. S. (1986). Dual activation of the inositol-trisphosphate-calcium and cyclic nucleotide intracellular signalling systems by adrenocorticotropin in rat adrenal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 742-748.

Fredlund P., Saltman S., Kondo T., Douglas J., Catt K. J. (1977). Aldosterone production by isolated glomerulosa cells: modulation of sensitivity to angiotensine II and ACTH by extracellular potassium concentration. *Endocrinology* 100, 481-486.

Fredlund P. S., Saltman S., Catt K. J. (1975). Aldosterone production by isolated adrenal glomerulosa cells: stimulation by physiological concentrations of angiotensine II. *Endocrinology* 97, 1577-1586.



Fujita K., Aguilera G., Catt K. J. (1979). The role of cyclic AMP in aldosterone production by isolated zona glomerulosa cells. J. Biol. Chem. 254, 8567-8574.

Gabbiani G., Chaponnier C., Lüscher E. F. (1975). Actin in the cytoplasm of adrenocortical cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 618-621.

Gallo-Payet N., Payet M. D. (1989). Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. J. Endocrinol. 120, 409-421.

Gallo-Payet N., Escher E. (1985). Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. Endocrinology 117, 38-40.

Grekin R. J., Dale S. L., Melby J. C. (1973). The role of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone in human adrenal tissue in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 261-264.

Gross F., Brunner H., Ziegler M. (1965). Renin-angiotensin system, aldosterone and sodium balance. Rec. Prog. Horm. Res. 21, 119-177.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.

Guillon G., Gallo-Payet N., Balestre M.-N., Lombard C. (1988). Cholera-toxin and corticotropin modulation of inositol phosphate accumulation induced by vasopressin and angiotensin II in rat glomerulosa cells. Biochem. J. 253, 765-775.

Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Archiv. 391, 85-100.

Hanin R., Tait S. A. S., Tait J. F. (1970). "in vitro" effects of ACTH, angiotensins, serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to aldosterone by isolated adrenal cells. Endocrinology 87, 1147-1167.

Hausdorff W. P., Sekura R. D., Aguilera G., Catt K. J. (1987). Control of aldosterone production by angiotensin II is mediated by two guanine nucleotide regulatory proteins. Endocrinology 120, 1668-1678.

Haüsler A., Monnet G., Borer C., Bhatnagar A. S. (1989). Evidence that corticosterone is not an obligatory intermediate in aldosterone biosynthesis in the rat adrenal. *J. Steroid Biochem.* 34, 567-570.

Hikida H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23, 5036.

Hosey M. M., Lazdunski M. (1988). Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Memb. Biol.* 104, 81-105.

Hyatt P. J., Tait J. F., Tait S. A. S. (1986). The mechanism of the effect of  $K^+$  on the steroidogenesis of rat zona glomerulosa cells of the adrenal cortex. Role of cyclic AMP. *Proc. Roy. Soc. London* 227, 21-42.

Idelman S. (1970). Ultrastructure of the Mammalian Adrenal Cortex. *Int. Rev. Cytol.* 27, 181-281.

Jacob R., Meritt J. E., Hallam T. J., Rink T. J. (1988). Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature* 335, 40-45.

Johnson E. I. M., Capponi A. M., Vallotton M. B. (1989). Cytosolic free calcium oscillates in single bovine adrenal glomerulosa cells in response to angiotensine II stimulation. *J. Endocrinol.* 122, 391-402.

Kelley L. L., Blackmore P. F., Graber S. E., Stewart S. J. (1990). Agents that raise cAMP in human lymphocytes release an intracellular pool of calcium in the absence of inositol phosphate production. *J. Biol. Chem.* 265, 17657-17664.

Kojima I., Shibata H., Ogata E. (1986). Pertussis toxin blocks angiotensin II-induced calcium influx but not inositol trisphosphate production in adrenal glomerulosa cells. *FEBS Letters* 204, 347-351.

Kojima I., Ogata E. (1986). Direct demonstration of adrenocorticotropin-induced changes in cytoplasmic free calcium with aequorin in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 261, 9832-9838.

Kojima I., Kojima K., Rasmussen H. (1985b). Characteristics of angiotensine II-,  $K^+$ - and ACTH-induced calcium influx in adrenal glomerulosa cells. Evidence that angiotensine II,  $K^+$ , and ACTH may open a common calcium channel. *J. Biol. Chem.* 260, 9171-9176.



Kojima I., Kojima K., Rasmussen I. (1985). Effects of AngII and  $K^+$  on  $Ca^{2+}$  efflux and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. Amer. J. Physiol. 248, E36-E43.

Kotchen T. A., Guthrie G. P., Galla J. H., Luke R. G., and Welch W. J. (1983). Effects of NaCl on renin and aldosterone responses to potassium depletion. Amer. J. Physiol. 244, E164-E169.

Kramer R. E., Gallant S., Brownie A. C. (1980). Actions of angiotensine II on aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. J. Biol. Chem. 225, 3442-3447.

Kurtzman N. A., Boonjaren S. (1975). Physiology of antidiuretic hormone and the interrelationship between the hormone and the kidney. Nephron 14, 167-185.

Lehoux, J. G. Factors controlling the biosynthesis of aldosterone. Dans Steroid Biochemistry, Vol II, CRC Press, Boca Raton, Florida, (1979), 51-81.

Lehoux J.-G., Sandor T., Henderson I. W., Chester-Jones I. (1974). Some aspects of the dietary sodium intake on the regulation of aldosterone biosynthesis in rats adrenals. Can. J. Biochem. 52, 1-6.

Lever J. D. (1955). Electron microscopy observations on the adrenal cortex. *Am. J. Anat.* 97, 409-429.

Li Z. G., Park D., Labella F. S. (1989). Adrenocorticotropin-(1-10) and -(11-24) promote adrenal steroidogenesis by different mechanisms. *Endocrinology* 125, 592-596.

Li C. H., Ng T. B., Chen C. H. K. (1982). Melanotropins: aldosterone- and corticosterone-stimulating activity in isolated rat adrenal cells. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 19, 361-365.

Liddle G. W. (1981). The Adrenals. Dans *Textbook of Endocrinology*, 6<sup>ème</sup> éd., W. B. Saunders Company, Philadelphia, (1981), 249-292.

Lobo M. V., Marusic E. T. (1982). Dissociation of aldosterone response to angiotensine II and potassium in the presence of strontium. *J. Steroid Biochem.* 16, 629-632.

Mahafee D. D., Ontjes D. A. (1980). The role of calcium in the control of adrenal adenylate cyclase. Enhancement of enzyme activation by guanylyl-5-yl imidophosphate. *J. Biol. Chem.* 255, 1565-1571.

Malgaroli A., Milani D., Meldolesi J., Pozzan T. (1987). Fura-2 measurements of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell Biol.* 105, 2145-2155.

Matsuoka H., Mulrow P. J., Franco-Saenz R., Li C. H. (1981a). Stimulation of aldosterone production by  $\beta$ -melanotropin. *Nature* 291, 155-159.

Matsuoka H., Mulrow P. J., Franco-Saenz R., Li C. H. (1981b). Effects of  $\beta$ -lipotropin and derived peptides on aldosterone production in the rat adrenal gland. *Amer. Soc. Clin. Invest.* 68, 752-759.

Matthews E. K., Saffran M. (1973). Ionic dependence of adrenal steroidogenesis and ACTH-induced changes in the membrane potential of adrenocortical cells. *J. Physiol.* 234, 43-64.

McCaa R. E., McCaa C.S., Guyton A. C. (1975). Role of angiotensine II and potassium in the long term of aldosterone secretion in intact conscious dog. *Circ. Res. Suppl. I* 36, I57-I67.

McKenna T. J., Island D. P., Nicholson W. E., Liddle G. W. (1978b). The effects of potassium on early and late steps in aldosterone biosynthesis in cells of the zona glomerulosa. *Endocrinology* 103, 1411-1416.

Mendelsohn F. A. O., Kachel C. D. (1981). Stimulation by serum of aldosterone production from rat adrenal glomerulosa cells in vitro: relationships to  $K^+$ , serotonin and angiotensin II. *Acta Endocrin.* 97, 231-242.

Mendelsohn F. A. O., Kachel C. D. (1980). Action of angiotensin I, II and III on aldosterone production by rat adrenal zona glomerulosa cells: importance of metabolism and conversion of peptides in vitro. *Endocrinology* 106, 1760-1767.

Mendelsohn F. A. O. (1979). Evidence for the local occurrence of angiotensin II in the rat kidney and its modulation by dietary sodium intake and converting enzyme blockade. *Clin. Sci.* 57, 173-179.

Meuli C., Muller J. (1983). Potassium intake and aldosterone biosynthesis: the role of cytochrome P-450. *J. Steroid Biochem.* 18, 167-171.



Millar J. A., McLean K. A., Reid J. L. (1981). Calcium antagonists decrease adrenal and vascular responsiveness to angiotensine II in normal human. Clin. Sci. 61, 65s-68s.

Millar J. A., McLean K. A., Sumner D. J., Reid J. L. (1983). The effect of the calcium antagonist nifedipine on pressor and aldosterone responses to angiotensine II in normal human. Eur. J. Clin. Pharmacol. 24, 315-321.

Missale C., Liberini P., Memo M., Carruba M. O., Spano P. (1986). Characterization of dopamine receptors associated with aldosterone secretion in rat adrenal glomerulosa. Endocrinology 119, 2227-2232.

Muller J., Lauber M., Schmid C. (1989). Potassium-induced aldosterone biosynthesis in cultured rat zona glomerulosa cells. Am. J. Physiol. 256, E475-E482.

Muller J. (1980). The conversion of 18-hydroxy-corticosterone and 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone to aldosterone by rat adrenal tissue: Evidence for an alternative biosynthetic pathway. J. Steroid Biochem. 13, 245-251.

Muller J., Baumann K. (1974). Multifactorial regulation of the final steps of aldosterone biosynthesis in the rat. J. Steroid Biochem. 5, 795-800.

Muller J. Regulation of aldosterone biosynthesis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y. (1971).

Muller J., Ziegler W. H. (1968). Stimulation of aldosterone biosynthesis "in vitro" by serotonin. Acta Endocrinol. 59, 23-35.

Natarajan R., Ploszaj S., Horton R., Nadler J. (1989). Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. Endocrinology 125, 3084-3089.

Nicholls M. G., Malvin E. A., Lun S., Miles K. D. (1983). Adrenal hormone responses to cerebroventricular angiotensin II in the sheep. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172, 330-333.

Nussdorfer G. G. (1980). Cytophysiology of the adrenal zona glomerulosa. Int. Rev. Cytol. 64, 307-368.

Nussdorfer G. G., Mazzochi G., Neri G., Robba C. (1978). Investigations into the mechanism of hormone release by rat adrenocortical cells. Cell Tissue Res. 189, 403-407.

Ontjes D. A. (1980). The pharmacologic control of adrenal steroidogenesis. Life Sci. 26, 2023-2035.

Payet M. D., Benabderrazik M., Gallo-Payet N. (1987). Excitation-secretion coupling: ionic currents in glomerulosa cells. Effect of ACTH and K<sup>+</sup> channel blockers. *Endocrinology* 121, 875-883.

Payet N., Deziel Y., Lehoux J.-G. (1984). Vasopressin: a potent growth factor in adrenal glomerulosa cells in culture. *J. Steroid Biochem.* 20, 449-454.

Payet N. (1981). Rôle de la vasopressine et de l'ACTH dans le contrôle de la croissance et de la fonction de la zona glomerulosa du rat femelle. Etudes "in vivo" et "in vitro". Thèse de doctorat. Université de Sherbrooke.

Payet N., Lehoux J.-G. (1980). A comparative study of the role of vasopressin and ACTH in the regulation of growth and function of the rat adrenals glands. *J. Steroid Biochem.* 12, 461-467.

Payet N., Isler H. (1976). Adrenal glomerulosa mitotic stimulation by posterior pituitary hormones. *Cell Tissue Res.* 12, 461-467.

Peytremann A., Brown R. D., Nicholson W. E., Island D. P., Liddle G. W., Hardmann J. G. (1974). Regulation of aldosterone synthesis. *Steroids* 24, 451-462.

Pratt J. H., Rothrock J. K., Dominguez J. H. (1989). Evidence that angiotensine II and potassium collaborate to increase cytosolic calcium and stimulate the secretion of aldosterone. *Endocrinology* 125, 2463-2469.

Pratt J. H. (1982). Role of angiotensine II in potassium-mediated stimulation of aldosterone secretion in the dog. *J. Clin. Invest.* 70, 667-672.

Prentki M., Biden T. J., Jarjic D., Irvine R. F., Berridge M. J., Wolhein C. B. (1984). Rapid mobilisation of  $\text{Ca}^{2+}$  from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 309, 562-564.

Quinn S. J., Williams G. H. (1988). Regulation of aldosterone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 50, 409-426.

Quinn J. J., Williams G. H., Tillotson D. L. (1988). Calcium oscillations in single adrenal glomerulosa cells stimulated by angiotensine II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5754-5758.

Quinn S. J., Cornwall M. C., Williams G. H. (1987). Electrical properties of isolated rat adrenal glomerulosa and fasciculata cells. *Endocrinology* 120, 903-914.



Radke K. J., Clendenin III R. E., Taylor Jr. R. E., Schneider E. G. (1989). Calcium dependence of osmolality-, potassium-, and angiotensine II-induced aldosterone secretion. *Amer. J. Physiol.* 256, E760-E764.

Rhodin J. A. G. (1971). The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. *J. Ultrastructure Res.* 34, 23-71.

Rocco S., Ambroz C., Aguilera G. (1990). Interaction between serotonin and others regulators if aldosterone secretion in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 127, 3103-3110.

Rubin R. P., Sheid B., McCauley R., Laychock S. G. (1974). ACTH-induced protein release from the perfused cat adrenal gland: Evidence for exocytosis? *Endocrinology* 95, 370-378.

Saez J. M., Morera A. M., Dazord A. (1981). Mediators of the effect of ACTH in adrenal cells. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14, 568-579.

Saez J. M., Morera A.-M., Dazord A., Bataille P. (1974). Interactions of ACTH with its adrenal receptors: specific binding of ACTH<sub>1-24</sub>, its o-nitrophenylsulfenyl derivative and ACTH<sub>11-24</sub>. *J. Steroid Biochem.* 5, 925-933.

Scanlon M., Williams D. A., Fay F. S. (1987). A  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive form of Fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 262, 6308-6321.

Schlegel W., Winiger B. P., Mollard P., Vacher P., Wuarin F., Zahnd G. R., Wollhein C. B., Dufy B. (1987). Oscillations of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in pituitary cells due to action potentials. Nature 329, 719-721.

Scholer D., Birkhauser M., Peytremann A., Riondel A. M., Valloton M. B., Muller A. F. (1973). Response of plasma aldosterone to angiotensine II, ACTH and potassium in man. Acta Endocrinol. 72, 293-307.

Schrieffrin E. L., Lis M., Gutkowska J., Genest J. (1981). Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in response of adrenal glomerulosa cells to angiotensine II, ACTH,  $\text{K}^+$  and ouabain. Amer. J. Physiol. 241, E42-E46.

Schwyzzer R., Schiller P., Seelig S., Sayers G. (1971). Isolated adrenal cells: log dose response curves for steroidogenesis induced by  $\text{ACTH}_{1-24}$ ,  $\text{ACTH}_{1-10}$ ,  $\text{ACTH}_{4-10}$  and  $\text{ACTH}_{5-20}$ . FEBS Letters 19, 229-231.

Shangold G. A., Murphy S. N., Miller R. J. (1988). Gonadotropin-releasing hormone-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients in single identified gonadotropes require both intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation and  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6566-6570.

Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., Euw J. V., Reichstein T. (1953). Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. Experientia 9, 333-335.

Skornick O. A., Paladin A. C. (1964). Significance of blood angiotensin levels in different experimental conditions. Can. Med. Ass. J. 90, 269.

Spat A., Balla I., Balla T., Cragoe Jr. E. J., Hajnoczky Gy., Hunyady L. (1989). Angiotensine II and potassium activate different calcium entry mechanisms in rat adrenal glomerulosa cells. J. Endocrinol. 122, 361-370.

Stauderman K. A., Pruss R. M. (1989). Dissociation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation responses to angiotensin II in bovine adrenal chromaffin cells. J. Biol. Chem. 264, 18349-18355.

Szalay K. S., Stark E. (1982). Effect of alpha-MSH on the corticosteroid production of isolated zona glomerulosa and zona fasciculata cells. *Life Sci.* 30, 2101-2108.

Tait J. F., Bell J. B. G., Hyatt P. J., Williams B. C. (1980) Further studies on the stimulation of rat adrenal capsular cells: four types of responses. *J. Endocrinol.* 87, 11-27.

Tait J. F., Tait S. A. S., Gould R. P., Mee M. S. R. (1974). The properties of adrenal zona glomerulosa cells after purification by gravitational sedimentation. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 185, 375-407.

Tait S. A. S., Tait J. F., Bradley J. E. S. (1972). The effect of serotonin and potassium on corticosterone and aldosterone production by isolated zona glomerulosa cells of the rat adrenal cortex. *Aust. J. Exper. Biol. Med. Sci.* 50, 833-846.

Thorner M. O., Holl R. W., Leong D. A. (1988). The somatotrope: an endocrine cell with functional calcium transients. *J. Exp. Biol.* 139, 169-179.

Tsien R. W., Tsien R. Y. (1990). Calcium channels, stores and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6, 715-760.



Tsien R. Y., Poenie M. (1986). Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. Trends Biochem. Sci. 11, 450-455.

Tsien R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature 290, 527-528.

Underwood R. H., Menachery A. I., Williams G. H. (1989). Effect of sodium intake on phosphoinositides and inositol trisphosphate response to angiotensin II,  $K^+$  and ACTH in rat glomerulosa cells. J. Endocrinol. 122, 371-377.

Vinson G. P., White house B. J., Dell A., Etienne T., Morris H. R. (1980). Characterization of an adrenal zona glomerulosa-stimulating component of posterior pituitary extracts as  $\alpha$ -MSH. Nature 284, 464-467.

Vinson G. P., Whitehouse B. J. (1973). The biosynthesis and secretion of aldosterone by the rat adrenal zona glomerulosa, and the significance of the compartmental arrangement of steroids. Acta Endocrinol. 72, 746-752.

Volpe P., Krause K.-H., Hashimoto S., Zorzato F., Pozzan T., Meldolesi J., Lew D. P. (1988). ``Calciosome'', a cytoplasmic organelle: The inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store of nonmuscle cells ? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1091-1095.

Wakabayashi T., Kurono C., Asano M. (1976). Steroidogenesis in the zona glomerulosa of the adrenal cortex. Bioenergetics 8, 27-53.

Wasserman D., Wasserman M. (1974). The fine structure of adrenal zona glomerulosa in the adult rat. Cell Tissue Res. 149, 236-243.

Weissberg P. L., Little R. J., Bobik A. (1989). Spontaneous oscillations in cytoplasmic calcium concentration in vascular smooth muscle. Am. J. Physiol. 256, C951-C957.

Williams G. H., Dluhy R. G. (1972). Aldosterone biosynthesis. Amer. J. Med. 53, 595-605.

Williams B. C., McDougall J. G., Tait J. F., Tait S. A. S. (1981). Calcium efflux and steroid output from superfused rat adrenal cells: effects of potassium, adrenocorticotrophic hormone, 5-hydroxytryptamine, adenosine 3',5'-monophosphate and angiotensins II and III. Clin. Sci. 61, 541-551.

Winter J.S.D., Gow K.W., Perry Y.S., Greenberg A.H. (1990). A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology* 127, 1904-1909.

Won J. G. S., Oki Y., Orth D. N. (1990). Roles of intracellular and extracellular calcium in the kinetic profile of adrenocorticotropin secretion by perifused rat anterior pituitary cells. II. Arginine, vasopressin, oxytocin, and angiotensin II stimulation. *Endocrinology* 126, 858-868.

Woodcock E.A., Little P.J., Tanner J.K. (1990). Inositol phosphate release and steroidogenesis in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J.* 271, 791-796.

Woods N. M., Cuthbertson K. S. R., Cobbold P. H. (1986). Repetitive transient roles in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319, 600-602.

Yakamado M., Franco-Saenz R., Mulrow P. J. (1982). A role for  $\beta$ -melanotropin in the regulation of aldosterone secretion during sodium deficiency in the rat. *Clin. Sci.* 63, 93s-95s.

Yanagibashi K., Haniu M., Shively J. E., Shen W. H., Hall P. (1986). The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 261, 3556-3562.

**ANNEXE:**



## Annexe 1

a. Composition du milieu de culture D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media).

(mg/L)

### Sels organiques

CaCl <sub>2</sub>	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O	0.1
KCl	400
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	200
NaCl	6400
NaHCO <sub>3</sub>	3700
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	125

### Vitamines

D-Ca pantothenate	4.0
Choline chloride	4.0
Acide cholique	4.0
i-inositol	7.2
Nicotinamide	4.0
Pyridoxal HCl	4.0
Riboflavine	0.4
Thiamine HCl	4.0

### Autres composants

D-glucose	4500
rouge de phénol	15.0

### Acides aminés

L-arginine	84
L-cystéine	48
L-glycine	30
L-histidine	42
L-isoleucine	105
L-leucine	105
L-lysine	146
L-phénylalanine	66
L-sérine	42
L-thréonine	95
L-tryptophane	15
L-tyrosine	72
L-valine	94

b. Composition du milieu OPTIMEM I

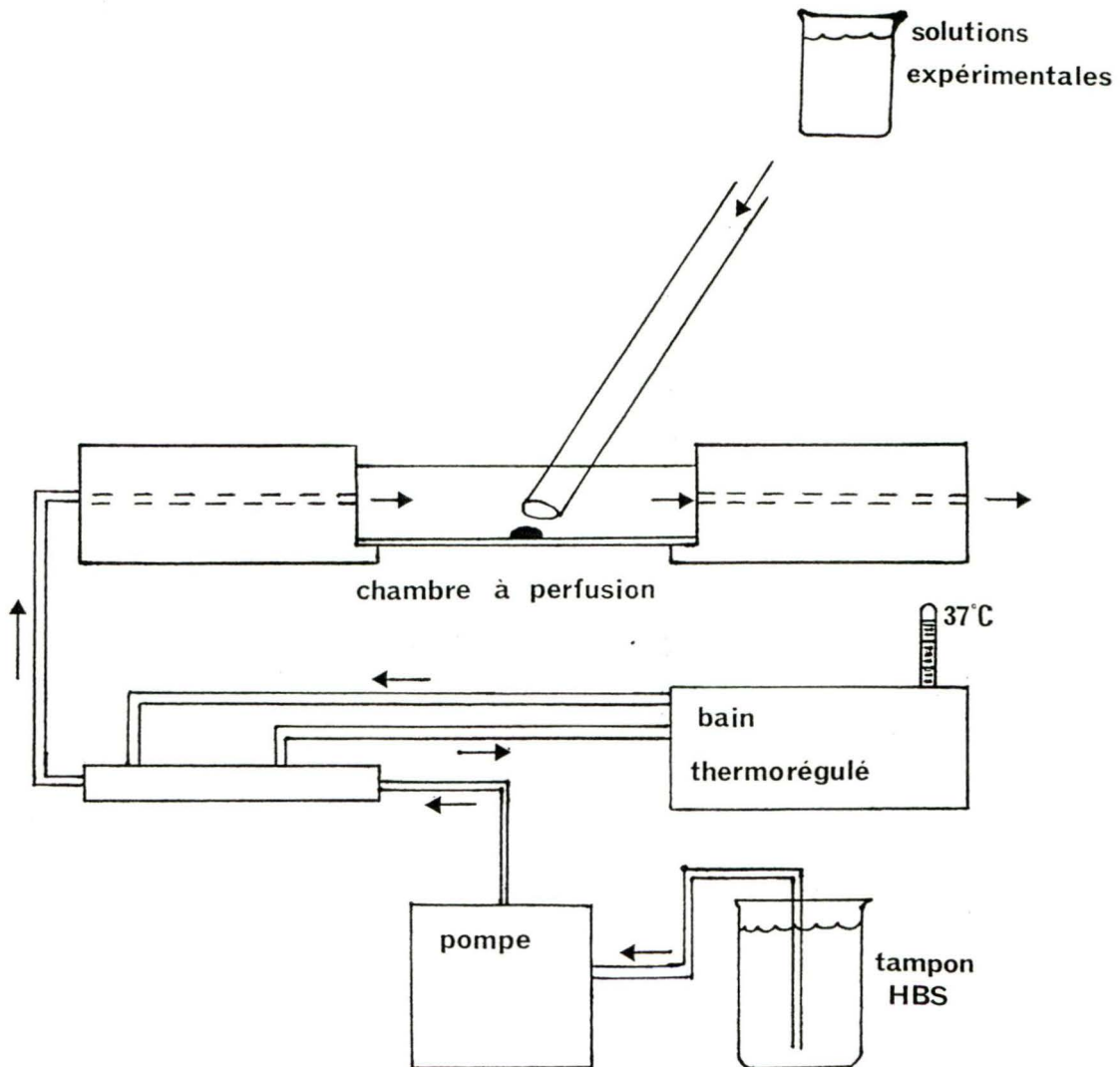
Ce milieu est une modification du milieu MEM auquel on a ajouté ces divers éléments:

- tampon HEPES
- bicarbonate de sodium (2400 mg/L)
- hypoxanthine
- thymidine
- pyruvate de sodium
- L-glutamine
- facteurs de croissance
- rouge de phénol (5 mg/L)

Le pH est ajusté à 7.4.

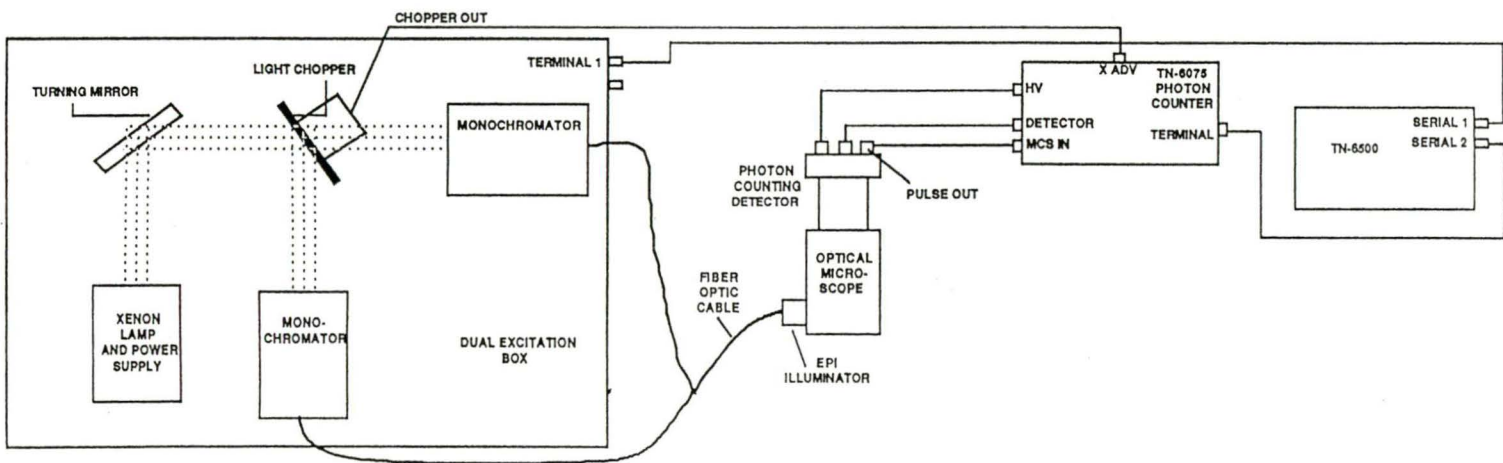
## Annexe 2

### Schéma du système de périfusion.



Annexe 3

Schéma du microspectrofluorimètre (Fluoroplex III).





Annexe 4

Schéma du système d'analyse d'image.

